



**Helena Cristina Correia de Oliveira** **Avaliação do efeito de metais pesados na fertilidade do ratinho**



**Helena Cristina Correia de Oliveira** **Avaliação do efeito de metais pesados na fertilidade do ratinho**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria Conceição Santos, Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro do Projecto CTS/22 do Instituto de Investigação da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Universidade de Aveiro através de uma bolsa de Doutoramento.

**Ao LUÍS E À BEATRIZ**

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor António Mendes dos Santos Moderno  
Professor Catedrático do Departamento de Didáctica e Tecnologia Educativa  
da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares  
Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Ana Dias Monteiro dos Santos  
Professora Catedrática do Departamento de Biologia da Universidade de  
Aveiro

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos  
Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor João Ramalho-Santos  
Professor Associado da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade  
de Coimbra

Doutora Ana Isabel Fernandes Grangeia  
Investigadora do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da  
Universidade do Porto

Prof. Doutora Teresa Margarida dos Santos  
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Esta tese de doutoramento não teria sido possível sem a colaboração de várias pessoas e instituições às quais desejo exprimir os meus profundos agradecimentos:

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pereira, pela possibilidade de realizar este trabalho, pela confiança em mim depositada para a sua concretização, bem como todo o apoio, disponibilidade e orientação científica.

À Professora Doutora Conceição Santos, pela co-orientação científica deste trabalho e pelo interesse, incentivo e entusiasmo com que tem acompanhado a minha formação académica.

Ao Doutor Marcello Spanò da ENEA Casaccia Research Centre em Roma por toda a simpatia e generosidade com que me acolheu no seu laboratório, e por todos os ensinamentos que me transmitiu, que foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor João Ramalho-Santos agradeço o interesse, a disponibilidade e o apoio que me dispensou durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Mário Sousa agradeço o interesse e as sugestões que muito valorizaram este trabalho.

Ao Departamento de Biologia pelas facilidades concedidas e ao CICECO pelo apoio financeiro.

Ao João Loureiro agradeço o apoio na citometria de fluxo.

À Tina Lopes pela ajuda na análise da instabilidade dos microssatélites.

À Patrizia Eleuteri e ao Michele Rescia por toda a colaboração durante o estágio na ENEA (Roma).

Ao Professor Doutor Miguel Guevara pelo desenvolvimento do Snakes.

Ao Sr. Rui e ao Eng.<sup>o</sup> Armando pela ajuda com o tratamento dos ratinhos. Um agradecimento muito especial ao Sr. Aldiro, não só pela ajuda no tratamento dos ratinhos, mas também por toda a disponibilidade e pela amizade que sempre me dedicou.

À Paula Mota e à Sandra Amaral (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) pela disponibilidade para a troca de ideias relativamente aos problemas com algumas das técnicas.

Aos colegas que compartilharam o laboratório comigo e que se tornaram também meus amigos, em especial à Janete, à Rita, à Tânia, à Luísa e ao Ricardo, pelos momentos de trabalho e amizade que partilhámos. Aos meus restantes amigos, em especial à Susana, pelo apoio nos momentos mais críticos.

Aos meus pais e irmão pelo apoio incondicional que sempre me dedicaram.

À minha filha Beatriz por encher os meus dias de sorrisos.

Ao meu marido Luís, por tudo.

## palavras-chave

Metais pesados, fertilidade masculina, citometria de fluxo, fluorescência, histopatologia

## resumo

A infertilidade é um problema actual que afecta cerca de 8 a 12% dos casais em idade fértil, sendo 50% dos casos atribuídos ao factor masculino. A exposição ocupacional e/ou ambiental a metais pesados representa uma das suas principais causas. O chumbo, o cádmio e o crómio são metais com elevada utilização industrial e muito persistentes no ambiente, sendo motivo de grande preocupação devido aos seus efeitos na saúde reprodutiva dos trabalhadores e da população em geral.

Neste trabalho estudaram-se os efeitos do cloreto de chumbo ( $\text{PbCl}_2$ ), cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) e cromato de potássio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) na fertilidade, usando como modelo ratinhos machos ICR-CD1. Os ratinhos foram injectados subcutaneamente com 74 e 100 mg de  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  ou com 5 e 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$ , respectivamente, durante 4 dias consecutivos ou com 1, 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  numa única injeção. Nos ensaios com  $\text{PbCl}_2$  e  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  os animais foram sacrificados 5 e 35 dias após o início da exposição, enquanto que nos ensaios com  $\text{CdCl}_2$  os animais foram sacrificados após 24 horas e 35 dias.

O cloreto de chumbo não alterou a histologia do testículo nem do epidídimo, mas induziu um aumento da percentagem de células em fase S no testículo. O cloreto de chumbo alterou também alguns parâmetros dos espermatozóides, tais como a motilidade, morfologia e integridade do acrossoma. Contudo, não foram observados efeitos na integridade do DNA ou na estrutura da cromatina. O cloreto de cádmio induziu lesões severas e não reversíveis nos testículos que, após 35 dias, reverteram em necrose testicular. O cloreto de cádmio alterou ainda as subpopulações de células testiculares após 24 horas e induziu IMS no testículo após 35 dias. Em consequência das lesões no testículo, a densidade espermática foi severamente afectada após 35 dias. A exposição ao cloreto de cádmio afectou também a morfologia, a motilidade e a integridade acrossómica nos espermatozóides. O cloreto de cádmio induziu ainda fragmentação do DNA nestas células após 35 dias.

O cromato de potássio alterou a morfologia dos espermatozóides e a integridade do acrossoma, sobretudo nos animais sacrificados após 35 dias. Verificou-se ainda uma redução da motilidade dos espermatozóides. Não foram detectados efeitos genotóxicos nos espermatozóides, devido à acção do  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  nas doses testadas.

Dos parâmetros avaliados neste trabalho, destacam-se duas novas abordagens, nomeadamente o programa informático Snakes e a análise do conteúdo em DNA de células de testículo, a partir de material incluído em parafina. O Snakes permitiu fazer medições rigorosas do diâmetro dos tubos seminíferos, enquanto que a fixação de amostras de testículo de ratinhos em formol tamponado e inclusão em parafina resultou numa boa preservação do DNA, possibilitando assim a quantificação das subpopulações de células testiculares por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros testados indicam que a motilidade dos espermatozóides e a integridade do acrossoma sejam parâmetros sensíveis à toxicidade de metais. O acrossoma aparenta ser um dos principais alvos da toxicidade dos metais e cuja reacção acrossómica prematura pode reduzir a capacidade do espermatozóide para fertilizar o oócito. Assim, este trabalho representa uma contribuição para uma melhor compreensão dos efeitos do chumbo, cádmio e crómio na fertilidade masculina.

## keywords

Heavy metals, male fertility, flow cytometry, fluorescence, histopathology

## abstract

Infertility is a nowadays major concern that affects about 8 to 12% of the couples and the male factor contributes for about 50% of the cases. Occupational and/or environmental exposure to heavy metals represents one of the major causes of male infertility. Lead, cadmium and chromium are heavy metals widely used in industry and quite persistent in the environment, raising major concerns over the possible effects on the reproductive health of workers and the general population.

In the present work, the effects on fertility of lead chloride ( $\text{PbCl}_2$ ), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) and potassium chromate ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) were studied using male ICR-CD1 mice as a model. Mice were subcutaneously injected with 74 and 100 mg  $\text{PbCl}_2$ /kg bw or 5 and 10 mg  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  for four consecutive days, or 1, 2 and 3 mg  $\text{CdCl}_2$  in a single injection. In  $\text{PbCl}_2$  and  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  assays, animals were sacrificed 5 and 35 days after the beginning of the experiment, while in  $\text{CdCl}_2$  assays the animals were sacrificed after 24 hours and 35 days.

Lead chloride did not induce histological changes on testis or epididymis, but induced an increase in the percentage of cells on S phase in the testis. Lead chloride also changed sperm parameters such as motility, morphology and acrosome integrity. However, no effects on sperm DNA integrity or chromatin structure were observed.

Cadmium chloride induced severe and irreversible lesions on mice testis, which resulted on testicular necrosis after 35 days. Cadmium chloride also changed testicular cell subpopulations after 24 hours and induced microsatellite instability on testis after 35 days. As a consequence of testicular lesions, sperm density was severely affected after 35 days. Cadmium chloride exposure also changed sperm morphology, motility and acrosome integrity. Moreover, this compound also induced sperm DNA fragmentation 35 days after exposure. Potassium chromate changed sperm morphology and acrosome integrity more pronounced on mice sacrificed after 35 days. A decrease on sperm motility was also observed. However, no genotoxic effects were detected on sperm after  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  exposure.

Amongst the array of assays performed in this work, two new approaches were developed and can be highlighted, namely the Snakes software and analysis of DNA content from paraffin embedded testicular samples. Snakes allowed accurate measurements of diameter of seminiferous tubules, while buffered formalin fixation and paraffin embedding of mice testicular samples allowed good DNA preservation, enabling the quantification of testis cells subpopulations by flow cytometry.

Taken together the results obtained with the different parameters tested indicate that sperm motility and acrosome integrity are sensitive to metal toxicity. The acrosome appears as a main target to metal toxicity, and its premature reaction may reduce the ability of sperm to fertilize the oocyte. Thus, this work contributes to a better understanding of lead, cadmium and chromium effects on male fertility.

"Ever since the Roman Empire declined and fell, assorted theorists have used the event as proof of their own notions about society's most important ills.

...Seabury Colum Gilfillan suggested that the Roman aristocracy died off in large part because of nothing more glamorous than simple lead poisoning.

If regularly introduced through mouth or lung in amounts greater than 1 mg. per day, lead can cause painful constipation, anemia, emaciation, loss of appetite, paralysis of the extremities, and ultimately death. And there is one more effect that interests Dr. Gilfillan most of all: enough lead can cause sterility in men, miscarriages and stillbirths among women...

The most significant source of lead poisoning was wine. To help preserve and sweeten it, the Romans added a syrup made of unfermented grape juice that had been boiled down in lead-lined pots, thereby greatly increasing the absorption of lead. "

Excerto da Revista Time de 23 de Fevereiro de 1966

<http://www.time.com/time/magazine/article/0,9171,842832,00.html>

## **PUBLICAÇÕES ORIGINAIS:**

Da presente tese resultaram os seguintes trabalhos originais:

### **- Artigos publicados:**

Guevara MA, Silva A, Oliveira H, Pereira ML, Morgado F. Segmentation and Morphometry of Histological Sections using Deformable Models: A new tool for evaluating testicular histopathology. In: Sanfeliu A, Shulcloper J R, editors. Progress in Pattern Recognition, Speech and Image Analysis: Ciarp 2003. Lect Notes Comput Sci 2003; 2905: 282-290.

Pereira ML, das Neves RP, Oliveira H, Santos TM, de Jesus JP. Effect of Cr(V) on reproductive organ morphology and sperm parameters: an experimental study in mice. Environ Health 2005; 27: 4-9.

Oliveira H, Loureiro J, Filipe L, Santos C, Ramalho-Santos J, Sousa M, Pereira ML. Flow cytometry evaluation of lead and cadmium effects on mouse spermatogenesis. Reprod Toxicol 2006; 22: 529-535.

Oliveira H, Spanò M, Santos C, Pereira ML. Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice. Cell Biol Toxicol 2009.;25:341-353.

Oliveira H, Spanò M, Guevara MA, Santos TM, Santos C, Pereira ML. Evaluation of *in vivo* reproductive toxicity of potassium chromate in male mice. Exp Toxicol Pathol 2009 doi:10.1016/j.etp.2009.05.009. *In Press*

Oliveira H., Spanò M, Santos C, Pereira ML. Adverse effects of cadmium exposure on mouse sperm. Reprod Toxicol 2009 doi:10.1016/j.reprotox.2009.08.001. *In Press*

### **- Artigo submetido:**

Oliveira H, Lopes T, Almeida T, Pereira ML, Santos C. Microsatellite instability in mice exposed to cadmium. Submetido ao Mutat Res.

### **- Capítulo de livro:**

Oliveira H, Spanò M, Santos C, Pereira ML. Flow cytometric analyses of sperm functions and genetic integrity. In: Glantz B, Edquist K, editors. Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects. Nova Publishers; 2010. (convite do editor). *In Press*.

No âmbito deste trabalho de doutoramento foi ainda publicado o seguinte trabalho:

Oliveira H, Santos TM, Ramalho-Santos J, Pereira M L. Histopathological effects of hexavalent chromium in mice kidney. Bull Environ Contam Toxicol 2006; 676: 977-983.



# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b><i>i</i></b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b><i>iii</i></b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b><i>xiii</i></b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Sistema reprodutor masculino .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 O testículo .....	19
1.1.1.1 Anatomia do testículo.....	19
1.1.1.2 Estrutura dos tubos seminíferos .....	21
1.1.1.3 A espermatogénese .....	22
1.1.2 O epidídimo.....	26
1.1.3 Estrutura do espermatozóide .....	27
<b>1.2 Infertilidade masculina .....</b>	<b>30</b>
<b>1.3 Efeitos do chumbo na fertilidade .....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Efeitos do cádmio na fertilidade.....</b>	<b>38</b>
<b>1.5 Efeitos do crómio na fertilidade.....</b>	<b>44</b>
<b>1.6 Estudos morfométricos do testículo .....</b>	<b>49</b>
<b>1.7 Selecção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo.....</b>	<b>50</b>
<b>1.8 Enquadramento e objectivos do trabalho .....</b>	<b>52</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>2.1 Químicos.....</b>	<b>55</b>
<b>2.2 Animais .....</b>	<b>55</b>

<b>2.3</b>	<b>Exposição a cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio .....</b>	<b>56</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise das alterações induzidas pelo cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio no testículo e epidídimo do ratinho .....</b>	<b>57</b>
2.4.1	Sacrifício dos animais .....	58
2.4.2	Análise histológica .....	58
2.4.2.1	Estudo morfométrico dos tubos seminíferos .....	59
2.4.3	Quantificação dos níveis de metais nos testículos por ICP-MS.....	59
2.4.4	Análise do conteúdo em DNA das células do testículo em amostras parafinadas e em fresco por citometria de fluxo .....	61
2.4.4.1	Amostras em fresco .....	61
2.4.4.1.1	Protocolo F1 .....	61
2.4.4.1.2	Protocolo F2 .....	61
2.4.4.1.3	Protocolo F3 .....	61
2.4.4.2	Amostras parafinadas .....	62
2.4.4.2.1	Protocolo P1 .....	62
2.4.4.2.2	Protocolo P2.....	62
2.4.4.3	Análise por citometria de fluxo.....	62
2.4.5	Avaliação da instabilidade dos microssatélites.....	64
2.4.5.1	Extracção e purificação do DNA genómico .....	64
2.4.5.2	Análise da instabilidade dos microssatélites .....	65
<b>2.5</b>	<b>Análise dos espermatozóides de ratinhos expostos a cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio.....</b>	<b>66</b>
2.5.1	Densidade.....	67
2.5.2	Morfologia.....	67
2.5.3	Integridade do acrossoma.....	67
2.5.4	Motilidade .....	68
2.5.5	Viabilidade .....	68
2.5.6	Função mitocondrial .....	69
2.5.7	Análise de quebras na cadeia de DNA por TUNEL .....	70
2.5.8	Anomalias da estrutura da cromatina por SCSA.....	71
2.5.9	Microscopia de fluorescência .....	73
<b>2.6</b>	<b>Tratamento estatístico .....</b>	<b>74</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>

<b>3.1</b>	<b>Estudo morfométrico dos tubos seminíferos .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2</b>	<b>Seleção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3</b>	<b>Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade do ratinho .....</b>	<b>82</b>
3.3.1	Avaliação da taxa de sobrevivência .....	82
3.3.2	Avaliação dos pesos .....	82
3.3.3	Análise histológica do testículo e epidídimo .....	83
3.3.3.1	Estudo morfométrico dos tubos seminíferos .....	85
3.3.4	Quantificação dos níveis de chumbo no testículo .....	86
3.3.5	Análise do conteúdo em DNA nuclear das células do testículo .....	87
3.3.6	Análise dos efeitos na função espermática .....	88
3.3.6.1	Densidade .....	89
3.3.6.2	Morfologia.....	89
3.3.6.3	Integridade do acrossoma .....	90
3.3.6.4	Motilidade.....	93
3.3.6.5	Viabilidade .....	93
3.3.6.6	Função mitocondrial .....	93
3.3.6.7	TUNEL.....	96
3.3.6.8	SCSA.....	98
<b>3.4</b>	<b>Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade do ratinho.....</b>	<b>100</b>
3.4.1	Avaliação da taxa de sobrevivência .....	100
3.4.2	Avaliação dos pesos .....	100
3.4.3	Análise histológica do testículo e epidídimo .....	102
3.4.3.1	Estudo morfométrico dos tubos seminíferos .....	104
3.4.4	Quantificação dos níveis de cádmio no testículo .....	104
3.4.5	Análise do conteúdo em DNA das células do testículo .....	107
3.4.6	Análise da Instabilidade de microssatélites no testículo .....	108
3.4.7	Análise dos efeitos na função espermática .....	110
3.4.7.1	Densidade .....	110
3.4.7.2	Morfologia.....	111
3.4.7.3	Integridade do acrossoma .....	112
3.4.7.4	Motilidade.....	113
3.4.7.5	Viabilidade .....	114
3.4.7.6	Função mitocondrial .....	115
3.4.7.7	TUNEL.....	116

3.4.7.8	SCSA.....	118
<b>3.5</b>	<b>Efeitos do cromato de potássio na fertilidade do ratinho .....</b>	<b>119</b>
3.5.1	Avaliação da taxa de sobrevivência .....	119
3.5.2	Avaliação dos pesos .....	119
3.5.3	Análise histológica do testículo e epidídimo .....	120
3.5.3.1	Estudo morfométrico dos tubos seminíferos .....	121
3.5.4	Quantificação dos níveis de crómio no testículo .....	122
3.5.5	Análise do conteúdo em DNA das células do testículo .....	122
3.5.6	Análise dos efeitos na função espermática .....	123
3.5.6.1	Densidade .....	123
3.5.6.2	Morfologia.....	125
3.5.6.3	Integridade do acrossoma .....	126
3.5.6.4	Motilidade.....	127
3.5.6.5	Viabilidade .....	128
3.5.6.6	Função mitocondrial .....	129
3.5.6.7	TUNEL.....	130
3.5.6.8	SCSA.....	130
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>133</b>
4.1	Estudos morfométricos do testículo.....	135
4.2	Seleção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo.....	136
4.3	Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade do ratinho .....	137
4.4	Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade do ratinho.....	142
4.5	Efeitos do cromato de potássio na fertilidade do ratinho .....	148
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>153</b>
5.1	Conclusões gerais .....	155
5.2	Perspectivas futuras .....	158
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>159</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>177</b>

## Abreviaturas

6-FAM	6-carboxifluoresceína
AE	Tampão de eluição
AL	Tampão de lise
ATL	Tampão de lise dos tecidos
AW1	Tampão de lavagem 1
AW2	Tampão de lavagem 2
BHT	Barreira hemato-testicular
BSA	Albumina de soro bovino
CV	Coeficiente de variação
DFI	"DNA fragmentation index" (Índice de fragmentação do DNA)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
FS	Dispersão frontal
FSH	Hormona estimuladora dos folículos
H&E	Hematoxilina-eosina
HDS	"High DNA Stainability"
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietilo)-1-piperazinilo)etano-sulfónico
Hex	6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína
ip	Intraperitoneal
ICP-MS	Espectroscopia de massa por plasma indutivamente acoplado
IMS	Instabilidade de microssatélites

IP	Iodeto de propídio
LA	Laranja de acridina
LH	Hormona luteinizante
MT6	Meio de Tyrode modificado 6
pc	Peso corporal
pf	Peso fresco
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reacção em cadeia da polimerase
Primer	Sequência nucleotídica iniciadora do PCR
Rh123	Rodamina 123
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
sc	Subcutânea
SCSA	"Sperm Chromatin Structure Assay"
SD-DFI	Desvio padrão-DFI
SS	Dispersão lateral
SYBR-14	"Sybergreen-14"
TdT	Desoxinucleotidil transferase
TUNEL	"Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling"
UI	Unidades internacionais

## Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática do sistema reprodutor masculino. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).....	19
Figura 2 Representação esquemática de uma secção longitudinal do testículo mostrando a localização dos tubos seminíferos e do epidídimo. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).....	20
Figura 3 Representação esquemática de parte de um tubo seminífero e dos tecidos intersticiais. No tubo seminífero estão representadas as células de Sertoli com as células germinativas associadas em diferentes estados de maturação. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).....	21
Figura 4 Representação esquemática da espermatogénese.....	24
Figura 5 Ciclo espermatogénico do ratinho. Cada coluna, designada de I a XII, representa os estadios. Os números de 1-16 designam as fases da espermiogénese. Adaptado de Russel et al (1990) .....	25
Figura 6 Cronologia do ciclo epermatogénico do ratinho: Tipo A e Tipo B- Espermatogónias; ES-Espermatócitos secundários (Adaptado de Piña-Guzmán et al 2005). .....	26
Figura 7 Representação esquemática do epidídimo do ratinho (Adaptado de Johnston et al 2005). As linhas demarcam os vários segmentos do epidídimo.....	27
Figura 8 Representação esquemática do espermatozóide humano (A) e do ratinho (B). (A) Adaptado de Alberts et al (2002); (B) Adaptado de Cao et al (2006). .....	28

- Figura 9 Secção sagital da cabeça do espermatozóide do homem (A) e do ratinho (B). A região a cinzento representa o acrossoma que se divide no acrossoma anterior (AA) e no segmento equatorial (ES). IAM- Membrana acrossómica interna, N- Núcleo, OAM- Membrana acrossómica externa, PAR- região Pós-acrossómica, PM- Membrana plasmática. Adaptado de Yoshinaga e Toshimori (2003). ..... 29
- Figura 10 Mecanismo da instabilidade de microssatélites (IMS). 1) Replicação do DNA; 2) Inserção de uma repetição CA na cadeia de replicação. Este erro é reparado pelas enzimas de reparação de erros de emparelhamento (3a) ou o erro não é reparado causando IMS (3b). A: adenina, C: citosina, G:guanina, T:timina. Adaptado de Söreide et al (2006). ..... 43
- Figura 11 Exemplo de uma aplicação do programa de medição do diâmetro dos tubos seminíferos Snakes: (A) snakes inicial, (B) imagem pré-processada (C) snakes final. .... 50
- Figura 12 Órgãos reprodutores do ratinho. 1) Local de incisão para remoção do epidídimo, 2) Local de incisão para remoção da cauda do epidídimo. Adaptado de Tayama et al (2006). ..... 58
- Figura 13 Representação esquemática de um citograma biparamétrico do SCSA. A verde está representada a população de células com DNA nativo (cadeia dupla) e a laranja e vermelho as populações com DNA desnaturado (cadeia simples). Adaptado de Evenson e Jost (2000). .... 72
- Figura 14 Correlação de Pearson entre as medições obtidas com a ferramenta e as medições obtidas com a ocular micrométrica. .... 77
- Figura 15 (página seguinte) Gráficos de citometria de fluxo das células isoladas a partir de tecido fresco pelos Protocolos F2 (A, B, C) e F3 (D, E, F) e tecido incluído em parafina pelos Protocolos P1 (G, H, I) e P2 (J, L, M). Os citogramas da coluna da esquerda mostram a dispersão frontal (FS) vs dispersão lateral (SS) da luz. Os histogramas da coluna ao centro



mostram a intensidade de fluorescência relativa (FL) do IP. Os citogramas da coluna à direita mostram o integral do pulso de fluorescência relativa vs a altura do pulso de fluorescência relativa. HC: pico sub-haplóide; 1C: pico haplóide; 2C: pico diplóide; 4C: pico tetraplóide. .... 80

Figura 16 Variação das percentagens de ploidia das células germinativas isoladas pelos Protocolos F2 e F3 (tecido fresco), e Protocolos P1 e P2 (tecido parafinado). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa para mesmo parâmetro entre amostras de tecido fresco e de tecido parafinado  $p < 0,05$ . .... 82

Figura 17 Efeito do cloreto de chumbo na histologia do testículo ao fim de 5 dias (A) controlo, (B) 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e ao fim de 35 dias (C) controlo, (D) 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$ . H&E. A barra representa 40  $\mu\text{m}$ . .... 84

Figura 18 Efeito do cloreto de chumbo na histologia do epidídimo ao fim de 5 dias (A) controlo, (B) 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e ao fim de 35 dias (C) controlo, (D) 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$ . H&E. A barra representa 40  $\mu\text{m}$ . .... 85

Figura 19 Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos administrados com 74 e 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e sacrificados após 5 dias ou 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo  $p < 0,001$ . .... 86

Figura 20 Concentração dos níveis de chumbo nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com 74 e 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e sacrificados 5 dias após o início da exposição. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo  $p < 0,001$ . .... 87

Figura 21 Percentagens relativas das células germinativas isolados de testículos de ratinhos controlo e administrados com cloreto de chumbo ao fim de 5 dias (A) e ao fim de 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro

padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ . ....	88
Figura 22 Efeito do cloreto de chumbo na densidade de espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. ....	89
Figura 23 Classificação morfológica dos espermatozóides de ratinho provenientes do epidídimo. A) Espermatozóides com morfologia normal, B-D) Anomalias na cabeça, E) Anomalias na peça intermediária, F, G) Anomalias na cauda, H) Anomalias múltiplas (cabeça e cauda). A barra representa 10 $\mu\text{m}$ para todas as imagens.	90
Figura 24 Espermatozóides de ratinho com acrossoma intacto, intensamente corado com Coomassie Blue(→) que se distinguem facilmente dos espermatozóides que já sofreram reacção acrossómica (*). A barra representa 10 $\mu\text{m}$ . ....	92
Figura 25 Efeito do cloreto de chumbo na integridade do acrossoma após 5 e 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. Os símbolos * e ** indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ e $p < 0,001$ , respectivamente. ....	92
Figura 26 Efeito do cloreto de chumbo na motilidade dos espermatozóides após 5 dias (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ . ....	94
Figura 27 Imagens de microscopia de fluorescência evidenciando: (A) espermatozóide morto marcado positivamente com IP; (B) espermatozóide vivo marcado positivamente com SYBR-14; (C) espermatozóide sem mitocôndrias funcionais, marcado negativamente para Rh123 e com a cabeça marcada positivamente com IP; (D) espermatozóide com mitocôndrias funcionais marcado positivamente com Rh123. A barra representa 10 $\mu\text{m}$ . ....	95

- Figura 28 Efeito do cloreto de chumbo na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. .... 95
- Figura 29 Efeito do cloreto de chumbo na função mitocondrial dos espermatozóides ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão..... 96
- Figura 30 Exemplo de um histograma relativo a espermatozóides no ensaio de TUNEL, o pico a cinzento corresponde ao controlo negativo (sem TdT); o pico a branco corresponde ao controlo positivo (incubado com DNase I, com TdT)..... 97
- Figura 31 Efeito do cloreto de chumbo na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. .... 97
- Figura 32 (página seguinte) Resultado do SCSA de uma amostra com baixa %DFI (A, B, C e D) e com elevada %DFI (E,F,G,H). A e E: citograma da dispersão fronal (FS) vs dispersão lateral da luz (SS). A região delimitada a rosa permite eliminar a parte do lixo ("debris"). B e F: citograma que mostra a fluorescência verde (DNA nativo) vs fluorescência vermelha (DNA fragmentado). A região delimitada a rosa permite seleccionar apenas os espermatozóides. A maioria das células agrupa-se num "cluster" com baixa fluorescência vermelha. Para a direita e para baixo deste "cluster" considera-se que as células apresentam %DFI. C e G: Histograma do DFI. Numa população normal, a maioria das células agrupa-se num pico. As células à direita desse pico consideram-se como apresentando %DFI. D e H: Histograma de fluorescência verde. As células mais à direita da população principal (intensa fluorescência verde) consideram-se como apresentando %HDS..... 98
- Figura 33 Efeito do cloreto de cádmio na histologia do testículo ao fim de 24 horas (A) controlo, (B) 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (C) 2 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (D) 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. \* edema intersticial. →ruptura do epitélio germinativo. A barra representa 40  $\mu$ m. .... 102

- Figura 34 Efeito do cloreto de cádmio na histologia do testículo ao fim de 35 dias (A) controlo, (B) 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (C) 2 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (D) 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. Coloração H&E. \* necrose testicular. A barra representa 40 µm. .... 103
- Figura 35 Efeito do cloreto de cádmio na histologia do epidídimo ao fim de 24 horas (A) controlo, (B) 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (C) 2 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (D) 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. \* células imaturas no epidídimo; ➔ fluido eosinófilo. A barra representa 40 µm..... 104
- Figura 36 Efeito do cloreto de cádmio na histologia do epidídimo ao fim de 35 dias (A) controlo, (B) 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (C) 2 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (D) 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. \* fluido e resíduos eosinófilos A barra representa 40 µm. .... 105
- Figura 37 Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos administrados com 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 24 horas após o início da exposição. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente à amostra controlo para  $p < 0,001$ . .... 106
- Figura 38 Concentração dos níveis de cádmio nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 24 horas após o início da exposição. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente à amostra controlo para  $p < 0,001$ ..... 106
- Figura 39 Percentagens de núcleos de células germinativas isolados de testículos de ratinhos controlo e administrados com cloreto de cádmio ao fim de 24 horas. Os valores representam a média ± erro padrão. Os símbolos \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. 107
- Figura 40 (página seguinte) Exemplos de IMS observados nas amostras de ratinhos expostos a CdCl<sub>2</sub>. O tamanho do alelo predominante (a cheio)

das amostras controlo foi comparado com o das amostras tratadas com cloreto de cádmio nos marcadores (A) Mus 1 e (B) Mus 5. A escala no topo das figuras indica o tamanho dos fragmentos e a escala à esquerda indica a intensidade da fluorescência, medida em unidades relativas de fluorescência. As amostras T1, T2, T3, T4 e T5 correspondem a amostras de testículo de ratinhos administrados com 1 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ ..... 108

Figura 41 Efeito do cloreto de cádmio na densidade de espermatozóides ao fim de 24 horas e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa para mesmo parâmetro entre amostras de ratinhos controlo e tratados com 1, 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  para  $p<0,001$ . ..... 111

Figura 42 Efeito do cloreto de cádmio na integridade do acrossoma após 24 horas e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p<0,05$ ..... 113

Figura 43 Efeito do cloreto de cádmio na motilidade dos espermatozóides ao fim de 24 horas (A) e ao fim de 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente..... 114

Figura 44 Efeito do cloreto de cádmio na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. .... 115

Figura 45 Efeito do cloreto de cádmio na função mitocondrial dos espermatozóides ao fim de 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p<0,05$ . ..... 116

Figura 46 Efeito do cloreto de cádmio na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL, ao fim de 24

horas (A) e ao fim de 35 dias (B). Em (A) a avaliação foi efectuada por citometria de fluxo e em (B) por microscopia de fluorescência. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,001$ . ....	117
Figura 47 Efeito do cromato de potássio na histologia do testículo após 5 dias (A) controlo, (B) 10 mg $K_2CrO_4$ /kg pc e após 35 dias (C) controlo, (D) 10 mg $K_2CrO_4$ /kg pc. H&E. A barra representa 40 $\mu m$ . ....	120
Figura 48 Efeito do cromato de potássio na histologia do epidídimo ao fim de 5 dias (A) controlo, (B) 10 mg $K_2CrO_4$ /kg pc e ao fim de 35 dias (C) controlo, (D) 10 mg $K_2CrO_4$ /kg pc. H&E. A barra representa 40 $\mu m$ . ....	121
Figura 49 Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos controlo e administrados com cromato de potássio e sacrificados 5 dias ou 35 dias após o início da exposição. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,001$ . ....	122
Figura 50 Concentração dos níveis de crómio nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com cromato de potássio e sacrificados 5 dias após o início da exposição. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,001$ . ....	123
Figura 51 Percentagens de células germinativas isoladas de testículos de ratinhos controlo e administrados com cromato de potássio e sacrificados ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. ....	124
Figura 52 Efeito do cromato de potássio na densidade de espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. ...	125
Figura 53 Efeito do cromato de potássio na integridade do acrossoma. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica	

diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p<0,05$ . .....	127
Figura 54 Efeito do cromato de potássio na motilidade dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p<0,05$ . ....	128
Figura 55 Efeito do cromato de potássio na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. ....	129
Figura 56 Efeito do cromato de potássio na função mitocondrial dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão.....	129
Figura 57 Efeito do cromato de potássio na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão.....	130

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade de roedores.....	35
Tabela 2 Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade de roedores.....	40
Tabela 3 Efeitos do cromato de potássio na fertilidade de roedores. ....	47
Tabela 4 Representação dos protocolos de administração dos compostos e dos sacrifícios dos animais. ✓: injeção; X: sacrifício. Para todos os grupos foi utilizado um n=5.....	57
Tabela 5 Programa de digestão das amostras em microondas.....	60
Tabela 6 Características dos microssatélites: <i>locus</i> , motivo repetido e sequências dos "primers". Adaptado de Kabbarah et al (2003). F- "forward"; R-"reverse".....	66
Tabela 7 Efeito do cloreto de chumbo no peso corporal, testicular e epididimal dos ratinhos e razão peso testicular/corporal e peso epididimal/corporal. Os valores representam a média ± erro padrão..	83
Tabela 8 Efeito do cloreto de chumbo na morfologia dos espermatozóides após 5 e 35 dias. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controle para $p < 0,05$ .....	91
Tabela 9 Efeitos do cloreto de chumbo na susceptibilidade da cromatina dos espermatozóides à desnaturação ácida, avaliada pelo ensaio SCSA, ao fim de 5 e de 35 dias. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do ensaio SCSA. Os valores representam a média ± erro padrão. ....	100



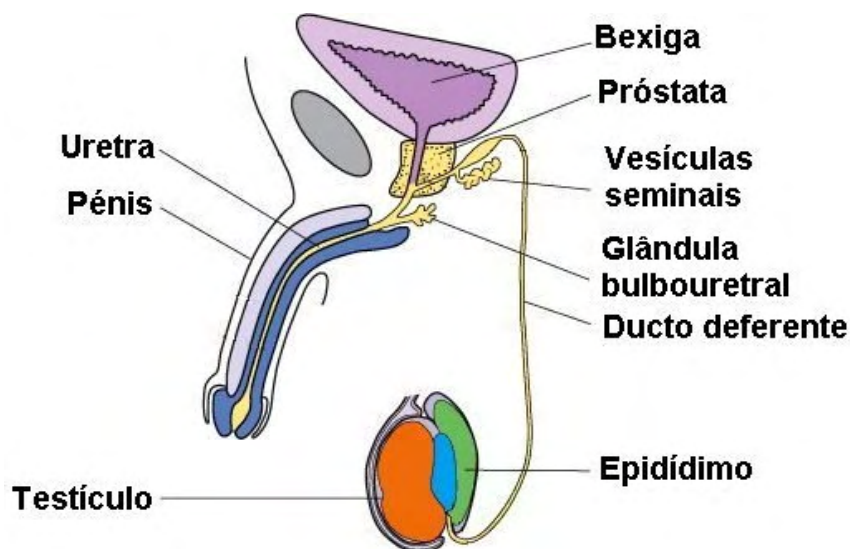
Tabela 10 Efeito do cloreto de cádmio no peso do corpo, testículo e epidídimo dos ratinhos e ainda nas razões peso do testículo/corpo e peso do epidídimo/peso do corpo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ . ....	101
Tabela 11 Análise das amostras que apresentaram IMS (mutações) com os marcadores testados. As amostras T1 a T5 correspondem a amostras de testículo de ratinhos administrados com 1 mg de $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ e sacrificados após 35 dias.....	110
Tabela 12 Efeito do cloreto de cádmio na morfologia dos espermatozóides após 24 horas e 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolos * e ** indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ e $p < 0,001$ , respectivamente.....	112
Tabela 13 Efeitos do cloreto de cádmio na susceptibilidade da cromatina dos espermatozóides à desnaturação ácida avaliada pelo ensaio SCSA ao fim de 24 horas. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do ensaio SCSA. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ . ....	118
Tabela 14 Efeito do cromato de potássio no peso do corpo, testículo e epidídimo dos ratinhos e ainda nas razões peso do testículo/corpo e peso do epidídimo/peso do corpo. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. ....	119
Tabela 15 Efeito do cromato de potássio na morfologia dos espermatozóides após 5 e 35 dias. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. O símbolo * indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para $p < 0,05$ . ....	126
Tabela 16 Efeitos do cromato de potássio na susceptibilidade da cromatina dos espermatozóides à desnaturação ácida avaliada pelo ensaio SCSA	

ao fim de 5 e de 35 dias. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do  
ensaio SCSA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. .... 131

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Sistema reprodutor masculino

O sistema reprodutor masculino (Figura 1) é constituído pelos testículos, onde ocorre a produção de gâmetas (espermatozoides) e por um sistema de ductos onde ocorre o transporte, maturação e armazenamento dos espermatozoides. Associado aos ductos existe um conjunto de glândulas acessórias que secretam o fluido seminal. O sistema reprodutor masculino inclui ainda o órgão copulador masculino, o pênis.



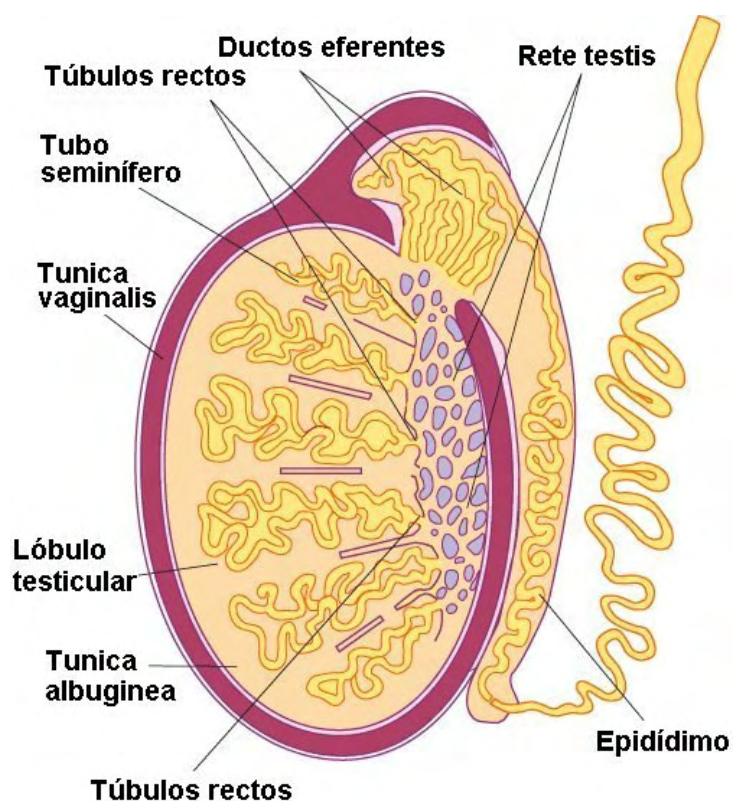
**Figura 1** Representação esquemática do sistema reprodutor masculino. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).

### 1.1.1 O testículo

#### 1.1.1.1 Anatomia do testículo

O testículo dos mamíferos está envolto pela *tunica vaginalis*, que por sua vez recobre uma cápsula de tecido conjuntivo rica em fibras de colagénio, a *tunica albuginea*. Na região posterior, a *tunica albuginea* apresenta um espessamento, o mediastino testicular, de onde partem os

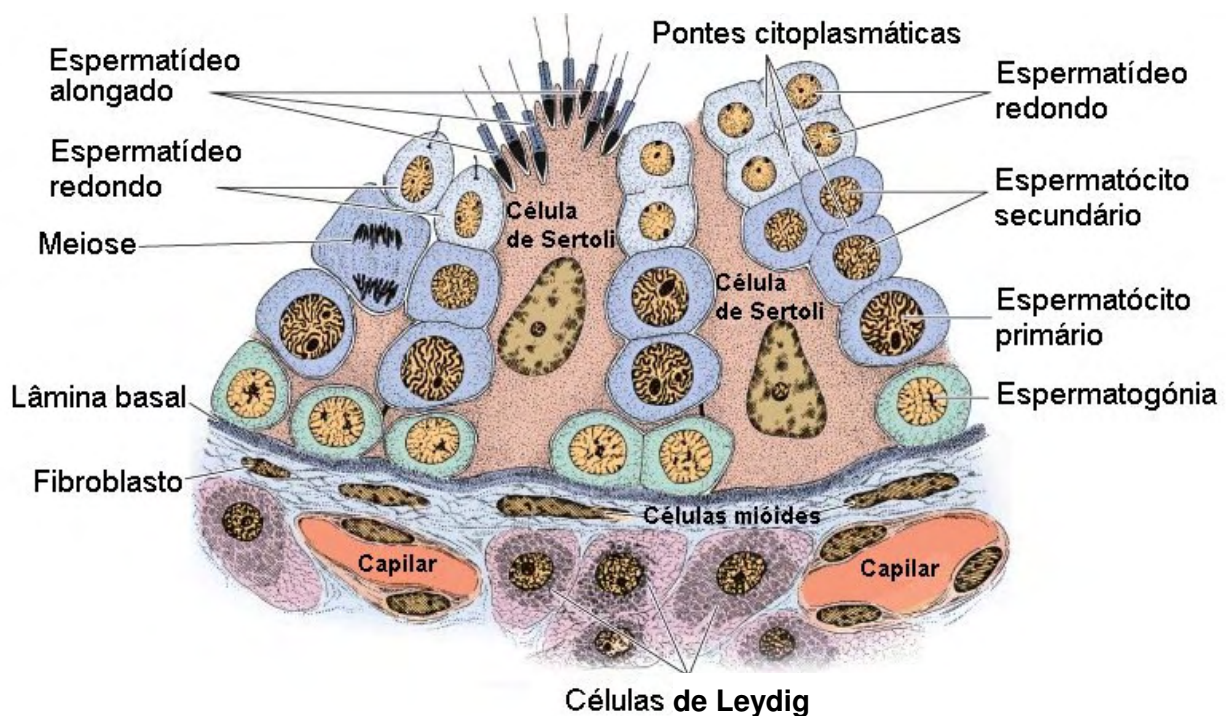
septos fibrosos que dividem o testículo em vários compartimentos, os lóbulos testiculares. Cada lóbulo é ocupado por tubos seminíferos imersos em tecido conjuntivo laxo contendo células intersticiais, ou de Leydig, responsáveis pela produção de androgénios, nomeadamente testosterona, e ainda macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos e vasos ou seios linfáticos, consoante as espécies (Creasy e Foster, 2002; Junqueira e Carneiro, 2005) (Figuras 2 e 3).



**Figura 2** Representação esquemática de uma secção longitudinal do testículo mostrando a localização dos tubos seminíferos e do epidídimo. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).

### 1.1.1.2 Estrutura dos tubos seminíferos

Os tubos seminíferos são túbulos longos extremamente enrolados que terminam nos túbulos rectos os quais drenam na *rete testis*, conjunto de canais escavados no seio da albugínea, de onde partem o ductos eferentes que penetram na proção cefálica do epidídimo (Figura 2). O epitélio seminífero assenta numa lâmina basal e é composto por células somáticas de suporte, as células de Sertoli, e uma população de células germinativas em várias fases de maturação. As únicas células que contactam directamente com a lâmina basal são as células de Sertoli e as espermatogónias. As restantes células da linhagem germinativa localizam-se em recessos das células de Sertoli, em íntimo contacto com estas células (Figura 3).



**Figura 3** Representação esquemática de parte de um tubo seminífero e dos tecidos intersticiais. No tubo seminífero estão representadas as células de Sertoli com as células germinativas associadas em diferentes estados de maturação. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2005).

### 1.1.1.3 A espermatogénese

À medida que progride a maturação, as células germinativas vão-se movendo na direcção do lúmen dos tubos onde serão libertadas (espermiação) seguindo depois para a *rete testis*. Este processo, que origina os espermatozóides a partir das espermatogónias, é denominado espermatogénese (Figura 4). No processo da espermatogénese podem ser distinguidas três etapas funcionais (Russel et al, 1990):

- Fase proliferativa: na qual as espermatogónias se multiplicam por mitose dando origem a células de reserva e, algumas, a elementos que seguem a via da diferenciação em espermatozóides.
- Fase meiótica: na qual os espermatócitos se dividem, por meiose, dando origem aos espermatídeos haplóides.
- Fase de diferenciação ou espermiogénese: na qual os espermatídeos se diferenciam em células estruturalmente especializadas para fertilizar o óvulo, os espermatozóides.

As células de Sertoli apresentam uma morfologia irregular e estão ligadas à lâmina basal por hemidesmosomas (Figura 3). A porção apical destas células prolonga-se até ao lúmen dos tubos seminíferos. As células de Sertoli ligam-se às células germinativas por várias junções celulares, algumas das quais são exclusivas destas células. As células de Sertoli adjacentes estão ligadas por junções de oclusão, que constituem o principal componente da barreira hemato-testicular (BHT) (Cheng e Mruk, 2002; Lui e Lee, 2008 para revisão).

As células de Sertoli têm um papel importantíssimo na integridade do epitélio seminífero, e as suas funções incluem a regulação da espermatogénese, suporte estrutural e metabólico para as células germinativas, libertação dos espermatozóides (espermiação), secreção de fluido tubular para o transporte dos espermatozóides e ainda a manutenção de uma barreira de permeabilidade entre o espaço intersticial e a luz dos tubos seminíferos. Qualquer perturbação destas funções pode comprometer seriamente a produção de espermatozóides (Creasy e Foster, 2002).

As espermatogónias representam a população de células precursoras das células germinativas. Contactam directamente com a lâmina basal, mas não estão ligadas à mesma. Consideram-se três categorias de espermatogónias (Russel et al, 1990; Creasy e Foster, 2002):

- Espermatogónias-mãe
- Espermatogónias-proliferativas
- Espermatogónias-em diferenciação

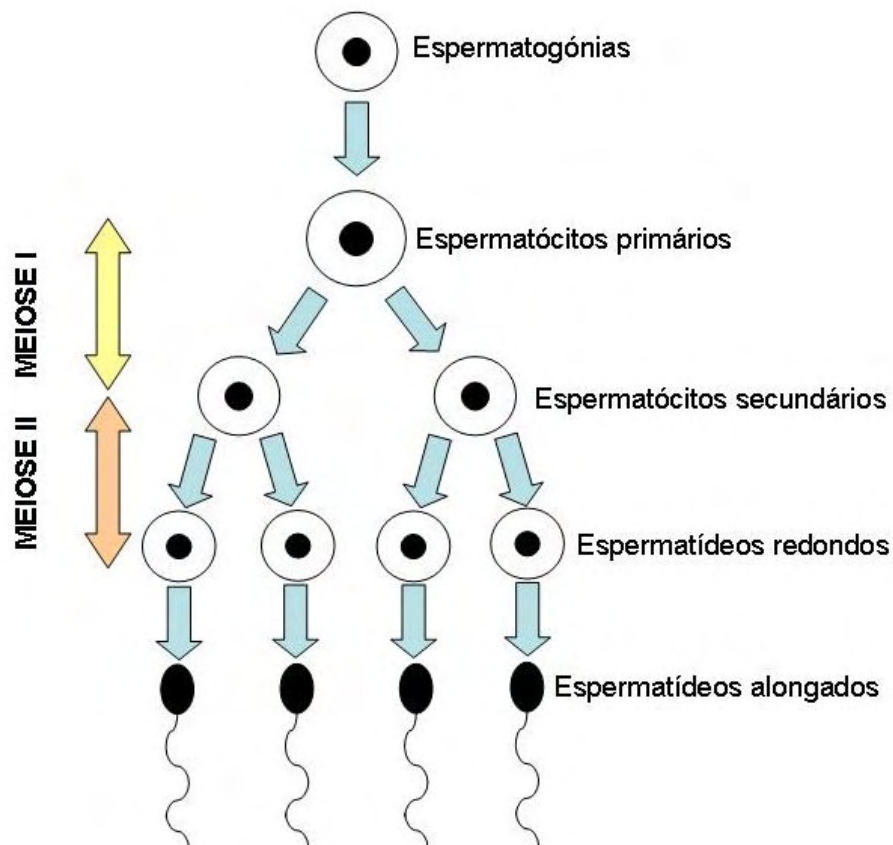
As espermatogónias tipo A - mãe e proliferativas - sofrem mitoses sucessivas, criando assim um reservatório de células e permitindo assim que algumas dessas células se diferenciem. As mitoses múltiplas sofridas por estas espermatogónias em diferenciação resultam na expansão da sua população. No grupo das espermatogónias em diferenciação foram descritas quatro gerações de espermatogónias tipo A (A1-A4), cada uma delas tendo origem na divisão mitótica da geração precedente. As espermatogónias do tipo A4, por sua vez, dividem-se originando espermatogónias intermediárias que irão dar origem as espermatogónias do tipo B (Creasy e Foster, 2002).

Os espermatócitos são formados a partir da última divisão mitótica das espermatogónias do tipo B (Figura 4). Estes sofrem a primeira divisão da meiose, passando pelos estadios de leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese. Desta primeira divisão meiótica resultam os espermatócitos secundários. A segunda divisão da meiose resulta na formação de células haplóides, os espermatídeos. Estas células sofrem posteriormente transformações morfológicas e funcionais com vista à formação de espermatozóides, processo denominado de espermiogénese (Creasy e Foster, 2002).

Na espermiogénese, o complexo de Golgi produz pequenos vacúolos condensados ou vesículas pró-acrossómicas contendo material denso ou grânulos pró-acrossómicos. Estes coalescem numa grande vesícula, a vesícula acrossómica. Esta apresenta uma forma arredondada até contactar com o núcleo, adquirindo posteriormente uma forma mais achatada. O núcleo vai também migrando na direcção da superfície celular, ficando a região acrossómica próxima da membrana celular. A polaridade da célula fica assim

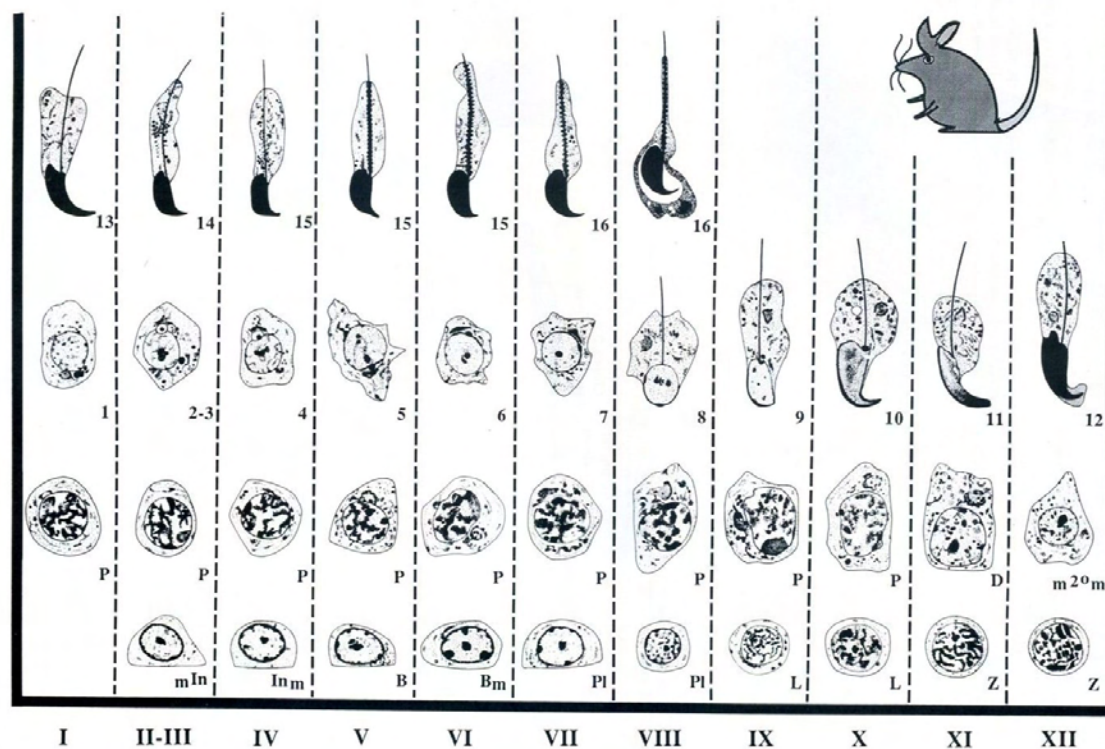


definida, surgindo a formação de uma região anterior (cabeça) e de uma região posterior (flagelo ou cauda). A célula começa então a adquirir uma forma alongada à medida que o citoplasma se alonga ao longo do flagelo. O complexo de Golgi afasta-se do acrossoma dirigindo-se à cauda da célula. Nesta fase, o acrossoma torna-se mais denso. O núcleo sofre um alongamento e uma condensação formando a cabeça do espermátídeo. No citoplasma forma-se a manchete, um conjunto de microtúbulos ligados ao núcleo, rodeando o segmento inicial do flagelo. O flagelo desenvolve-se a partir do centríolo distal e está rodeado por fibras orientadas longitudinalmente. As mitocôndrias migram formando uma banda em volta destas fibras (Russel et al, 1990). Na fase final da espermiogénese, o volume central do citoplasma do espermátídeo é reduzido devido à fagocitose pelas células de Sertoli.



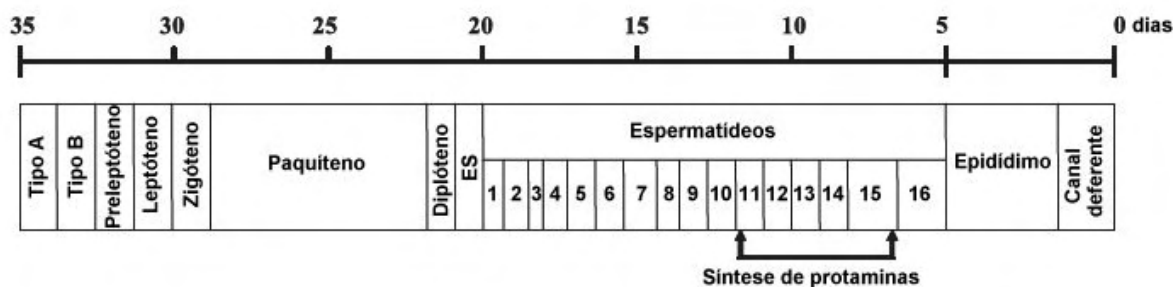
**Figura 4** Representação esquemática da espermatogénese.

A classificação do ciclo espermatogénico do ratinho é baseada na descrição feita por Oakberg (1956) e actualizada por Russel e colaboradores (1990) (Figura 5). Na espermiogénese do ratinho reconhecem-se 16 fases representadas em numeração árabe (1-16). Com base nas diferentes associações de células presentes nos tubos seminíferos, consideram-se ainda 12 estádios, representados em numeração romana (I-XII) (Russel et al, 1990).



**Figura 5** Ciclo espermatogénico do ratinho. Cada coluna, designada de I a XII, representa os estádios. Os números de 1-16 designam as fases da espermiogénese. Adaptado de Russel et al (1990)

A duração da espermatogénese varia para cada espécie. No caso do ratinho, este processo dura cerca de 34,5 dias (Figura 6), enquanto que no rato dura cerca de 51,6 dias e no homem cerca de 64 dias (Creasy e Foster, 2002).



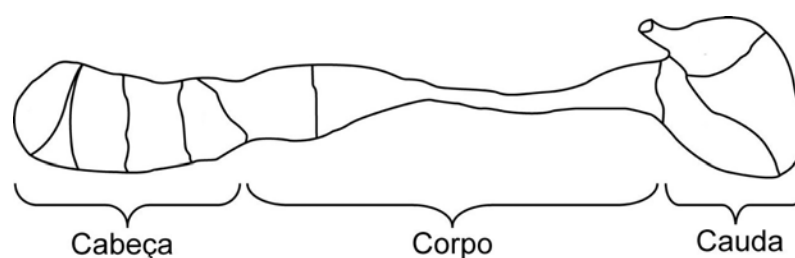
**Figura 6** Cronologia do ciclo espermatogênico do ratinho: Tipo A e Tipo B- Espermatogônias; ES-Espermatócitos secundários (Adaptado de Piña-Guzmán et al 2005).

### 1.1.2 O epidídimo

O epidídimo nos mamíferos adultos é um ducto longo e enovelado revestido por epitélio pseudo-estratificado colunar com estereócilios e rodeado por fibras musculares lisas, cujas contrações peristálticas permitem o movimento dos espermatozóides ao longo do ducto (Junqueira e Carneiro, 2005). No epidídimo do ratinho podem distinguir-se três zonas principais, a cabeça, o corpo e a cauda (Figuras 7 e 12). Cada uma destas regiões, por sua vez, divide-se em segmentos que consistem em lóbulos de ducto enrolado, rodeado por septos de tecido conjuntivo. O número de segmentos do epidídimo varia de acordo com a espécie. No ratinho, o epidídimo apresenta 10 segmentos tal como mostra a Figura 7 (Johnston et al, 2005). A espessura do epitélio e o diâmetro dos ductos varia consoante a zona do epidídimo. A zona da cabeça apresenta uma maior espessura de epitélio e um menor lúmen, contrariamente à zona da cauda, que apresenta uma menor espessura de epitélio, mas um maior lúmen. Do mesmo modo, o número de espermatozóides presentes no lúmen também aumenta do corpo para a cauda. A barreira hemato-epidídimal, constituída pelas junções de oclusão entre as células do epitélio do epidídimo proporciona aos espermatozóides um ambiente privilegiado, no qual estes gâmetas permanecem isolados (Turner, 2008).

As principais funções do epidídimo são o transporte dos espermatozóides, a sua maturação (aquisição de potencial fertilizante) e o seu

armazenamento (Robaire e Viger, 1995). Em termos funcionais, os espermatozóides presentes no testículo e na zona proximal do epidídimo são imóveis e imaturos, enquanto que os da zona distal são móveis e maduros, com capacidade de movimento progressivo, de fertilização, de reconhecimento da zona pelúcida e de realização da reacção acrossómica (Lakoski et al, 1988).



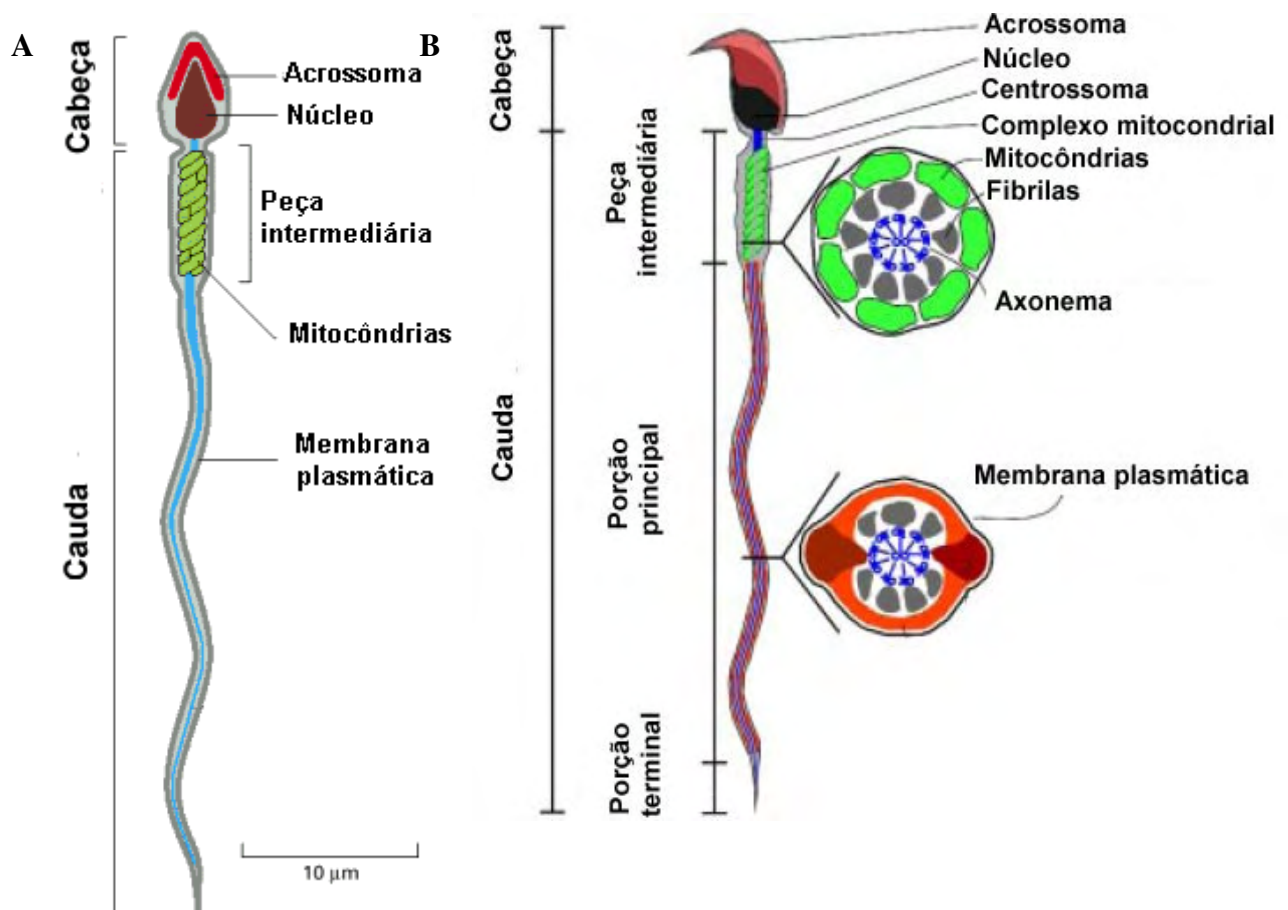
**Figura 7** Representação esquemática do epidídimo do ratinho (Adaptado de Johnston et al 2005). As linhas demarcam os vários segmentos do epidídimo.

### 1.1.3 Estrutura do espermatozóide

O espermatozóide é uma célula muito diferenciada, constituída por duas partes principais, a cabeça e a cauda ou flagelo (Figura 8). A cabeça é constituída pelo acrossoma e pelo núcleo (Figura 9).

O acrossoma ou vesícula acrossómica é muito rico em enzimas, nomeadamente glicohidrolases (eg hialuronidase), proteases (eg acrosina/proacrosina) e ainda esterases, sulfatases, fosfatases e fosfolipases (Tulsiani et al, 1998). Este elevado teor enzimático é determinante na penetração do espermatozóide na matriz extracelular do oócito (zona pelúcia), denominada reacção acrossómica. A reacção acrossómica ocorre após a ligação do espermatozóide com acrossoma intacto à zona pelúcida e envolve a fusão entre a membrana plasmática do espermatozóide e a membrana acrossómica externa. Durante este processo, os componentes do acrossoma são exocitados e interagem com a zona pelúcida. Para que a reacção acrossómica ocorra é necessário que os espermatozóides sofram

uma série de alterações bioquímicas e funcionais denominadas de capacitação, que conduzem à hiperactivação dos espermatozóides e lhes permite penetrar na zona pelúcida (Tulsiani et al, 1998).

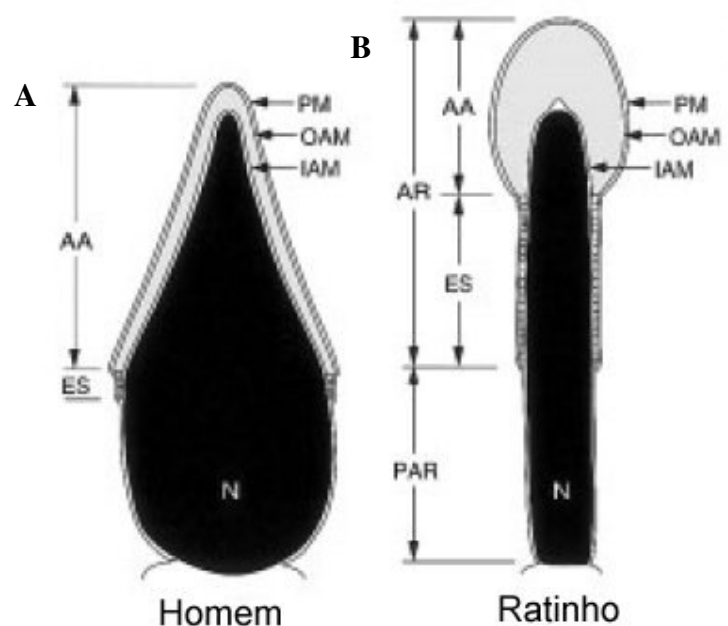


**Figura 8** Representação esquemática do espermatozóide humano (A) e do ratinho (B). (A) Adaptado de Alberts et al (2002); (B) Adaptado de Cao et al (2006).

O núcleo ocupa grande parte da cabeça do espermatozóide e é extremamente condensado, devido à grande compactação da cromatina (Fuentes-Mascorro et al, 2000).

Na cauda podem ser distinguidas três regiões, a peça intermediária, a porção principal e a porção terminal. Estas regiões apresentam em comum uma estrutura microtubular designada de axonema, constituída por nove pares de microtúbulos (dupletos) dispostos em círculo na periferia e por um par central. A peça intermediária situa-se na base da cabeça e é nesta região

que se localizam o centríolo proximal e o distal, que constituem o centrossoma. Na peça intermediária estão também presentes 9 fibras densas externas, emparelhadas com os 9 pares de microtúbulos periféricos e ainda o complexo mitocondrial, que contém as mitocôndrias do espermatozóide, com orientação helicoidal em torno das fibras densas externas. Sete das 9 fibras densas externas prolongam-se para a porção principal, mas as fibras 3 e 8 são substituídas por colunas longitudinais de bainha fibrosa. A porção terminal dos espermatozoides contém apenas o axonema (Cao et al, 2006).



**Figura 9** Secção sagital da cabeça do espermatozóide do homem (A) e do rato (B). A região a cinzento representa o acrossoma que se divide no acrossoma anterior (AA) e no segmento equatorial (ES). IAM- Membrana acrossômica interna, N- Núcleo, OAM- Membrana acrossômica externa, PAR- região Pós-acrossômica, PM- Membrana plasmática. Adaptado de Yoshinaga e Toshimori (2003).

## 1.2 Infertilidade masculina

A infertilidade pode ser definida como a incapacidade de conceber após um ano de relações sexuais desprotegidas (de Melo-Martin, 2002). Este problema afecta cerca de 8 a 12% dos casais em idade reprodutiva (WHO, 1991). O factor masculino contribui para cerca de metade dos casos (Bhasin et al, 1994; de Kretser e Baker, 1999).

As causas da infertilidade masculina são muito vastas, desde anomalias congénitas, como é o caso da varicocelo (de Kretser e Baker, 1999) e de alterações endócrinas no eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Diemer e Desjardins, 1999) ou anomalias genéticas, nomeadamente anomalias no cariótipo como o síndrome de Klinefelter, microdelecções no cromossoma Y, mutações ou polimorfismos de genes (Ferlin et al, 2006). A infertilidade masculina pode também ser adquirida através de infecções urogenitais (Dohle, 2003), factores imunológicos como a presença de anticorpos anti-espermatozóides (Francavilla et al, 2007), lesões traumáticas nos órgãos genitais, ou ainda devido à exposição a agentes tóxicos. Relativamente à infertilidade originada pela exposição a estes agentes, há uma grande variedade que está reconhecida como tendo influência na fertilidade masculina. Destes, destacam-se a exposição a radiação, a calor intenso e ainda a substâncias químicas como algumas drogas, medicamentos, solventes, pesticidas e metais pesados (de Kretser e Baker, 1999; Jensen et al, 2006).

A crescente industrialização e a poluição ambiental têm feito aumentar, nos locais de trabalho e no ambiente em geral, os níveis de exposição a poluentes, que estarão na origem de alterações na fertilidade (Figà-Talamanca et al, 2001; Jensen et al, 2006; Saradha e Mathur, 2006). A caracterização dos efeitos da exposição, por exemplo a metais pesados, e a determinação da relação dose-resposta, são dados indispensáveis para a elaboração de recomendações relativas aos limites de exposição e prevenção de factores de risco.

### 1.3 Efeitos do chumbo na fertilidade

O contacto humano com o chumbo é feito essencialmente por via ocupacional e/ou por via ambiental, devido à sua ampla utilização industrial. O chumbo entra na composição de muitos produtos utilizados no dia-a-dia, nomeadamente na construção de baterias, produção de tintas e vernizes e, até recentemente, como aditivo para gasolina (ATSDR, 1999a). O chumbo é também amplamente utilizado a nível industrial, nomeadamente em revestimento de cabos eléctricos, e em processos de soldadura (ATSDR, 1999a). Como consequência, o chumbo tornou-se um factor de grande preocupação para a saúde pública devido à sua elevada toxicidade e grande persistência no ambiente.

Uma grande variedade de estudos referem os efeitos tóxicos do chumbo nos ossos (Silbergeld, 1990), na hematopoiese (Gurer-Orhan et al, 2004) nas funções hepática e renal (Ekong et al, 2006), nos sistemas imunitário (Barsaran e Underger, 2000), nervoso (Silbergeld, 1990) e reprodutor (Hernandez-Ochoa et al, 2005).

Os efeitos tóxicos do chumbo nos órgãos reprodutores têm sido investigados durante anos na espécie humana e em modelos animais (Apostoli et al, 1998). Têm sido propostos vários mecanismos para a sua reprotoxicidade, embora muitos aspectos permaneçam ainda inexplicados e/ou controversos. Por exemplo, alguns autores atribuem uma acção directa do chumbo no testículo, resultando numa diminuição da qualidade/função espermática (eg Apostoli et al, 1998; Wadi e Ahmad, 1999). Outros sugerem que este actua no eixo hipotálamo-hipófise, interferindo assim no equilíbrio hormonal (eg Thoreux-Manlay et al, 1995; Sokol et al, 2002).

Estudos anteriores demonstraram que a exposição ocupacional ao chumbo (níveis de chumbo no sangue superiores a 40 µg/dL) estão associados a uma diminuição da qualidade dos espermatozóides (Alexander et al, 1996; Telisman et al, 2000) e redução da fecundidade (Sallmén 2001; Shiau et al, 2004). Além disso, Bonde e colaboradores sugerem que a estrutura da



cromatina seja afectada a níveis de chumbo no sangue superiores a 45 µg/dL (Bonde et al, 2002).

Os estudos em animais sobre os efeitos do chumbo na qualidade espermática e nos órgãos reprodutores mostraram efeitos também controversos (Tabela 1). A exposição a 0,5% de acetato de chumbo desde o primeiro dia de vida intra-uterina até ao 60º dia após o nascimento não revelou alterações significativas, quer na histologia do testículo, quer nos parâmetros espermáticos (Pinon-Lataillade et al, 1995). Por outro lado, Acharya e colaboradores (2003) descreveram o aumento da percentagem de espermatozóides anormais em ratinhos administrados via ip com 100 mg acetato de chumbo/kg pc. Num outro estudo, no qual ratos foram administrados com 10 mg acetato de chumbo/kg pc uma vez por semana durante 6 e 9 semanas, foram encontradas alterações no período mais longo, nomeadamente uma redução do número de espermatozóides e na concentração absoluta dos espermatozóides móveis (Hsu et al, 1997) (Tabela 1). Outros estudos reportaram o efeito esteroideogénico do chumbo em ratos Wistar machos (Sokol e Berman, 1991). Moorman e colaboradores mostraram também a relação entre o aumento dos níveis de chumbo no sangue e a deterioração dos parâmetros espermáticos em coelhos (Moorman et al, 1998).

Por outro lado, sabe-se que os compostos de chumbo originam stress oxidativo, devido à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Marchlewicz et al, 1993; Acharya e Acharya 1997; Hsu et al, 1998) que podem causar peroxidação lipídica e, conseqüentemente, alterações nas funções celulares (eg motilidade e capacidade de se fundir com o oócito) (Agarwal et al, 2008). Sendo os espermatozóides células ricas em compostos lipídicos (Saleh e Agarwal, 2002; Sanocka e Kurpisz, 2004), e apresentando baixa capacidade antioxidativa, uma vez que possuem baixos níveis de enzimas antioxidantes no citoplasma, estão mais propensos aos danos oxidativos (Saleh e Agarwal, 2002).

Os parâmetros geralmente avaliados no estudo da função espermática incluem a determinação da concentração e a avaliação da motilidade e da morfologia. Estes parâmetros são geralmente marcadores biológicos

considerados sensíveis à acção dos tóxicos, contudo, não permitem avaliar a ocorrência de alterações na integridade genética dos espermatozóides.

Nos mamíferos, durante as últimas fases da espermatogénese, a estrutura da cromatina é reorganizada com a substituição das histonas nucleossómicas por protaminas, de modo a promover uma maior compactação da cromatina. A Protamina 1 (P1) está presente no núcleo dos espermatozóides de todos os mamíferos, enquanto que a Protamina 2 (P2) apenas foi encontrada em algumas espécies, que incluem o homem e o ratinho. A P2 é uma proteína “Zn-finger”, muito importante na organização da cromatina (Fuentes-Mascorro et al, 2000 para revisão). Assim, é essencial uma estrutura adequada da cromatina para a capacidade fertilizante dos espermatozóides, uma vez que anomalias na estrutura da cromatina podem afectar a sua capacidade fertilizante (Fuentes-Mascorro et al, 2000). As alterações na estrutura da cromatina estão geralmente relacionadas com a fragmentação do DNA ou com a reduzida compactação da cromatina. Um aumento da percentagem de espermatozóides com anomalias no DNA/cromatina tem sido relacionado com dificuldades na concepção quer *in vivo* (Spanò et al, 2000), quer no contexto da reprodução medicamente assistida (Bungum et al, 2007).

As técnicas mais comuns para a avaliação da integridade do DNA são o “Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling” (TUNEL) e o “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA). O ensaio de TUNEL quantifica a incorporação de desoxiuridina trifosfato (dUTP) nos locais de quebra no DNA, numa reacção catalizada pela enzima desoxinucleotidil transferase (TdT). O SCSA avalia a susceptibilidade à desnaturação ácida do DNA espermático *in situ* usando o corante metacromático laranja de acridina. O SCSA quantifica a transição de fluorescência de verde para vermelho da laranja de acridina, devido à transição do DNA de cadeia dupla para cadeia simples após a desnaturação. A extensão da desnaturação é expressa através do índice de fragmentação do DNA (“DNA fragmentation Index”, DFI) (Evenson e Jost, 2000).

Em certa medida, o TUNEL e o SCSA podem complementar-se, dado que os espermatozóides com elevada sensibilidade à desnaturação possuem também elevada fragmentação do DNA, e os seus resultados são correlacionáveis, embora não se sobreponham (Stahl et al, 2006), reforçando a ideia de que cada uma destas técnicas avalia um aspecto particular da condensação nuclear do espermatozóide (Perreault et al, 2003).

Johansson e Pellicciari (1988) sugerem que o chumbo aumenta a condensação nuclear dos espermatozóides devido à interacção com grupos sulfidrilo adjacentes durante a formação de ligações sulfidrilo, que constitui uma das fases finais da condensação da cromatina no epidídimo. Mais recentemente, Hernandez-Ochoa e colaboradores (2006) sugeriram que cerca de 72% do chumbo é incorporado no núcleo do espermatozóide durante o seu desenvolvimento no testículo, sendo os restantes 28% incorporados durante a sua maturação no epidídimo. Estes autores referiram também que a incorporação do chumbo durante a maturação do espermatozóide no epidídimo conduzia a uma diminuição da condensação da cromatina e a um aumento da "High DNA Stainability" (%HDS). Por outro lado, quando o chumbo era incorporado no núcleo dos espermatozóides durante a sua maturação no epidídimo, estes apresentavam uma diminuição da %HDS, devido a uma maior condensação da cromatina.

Assim, como complemento aos estudos funcionais de fertilidade, torna-se essencial a avaliação do efeito do chumbo directamente nos espermatozóides, incluindo a avaliação do efeito deste metal na estrutura da cromatina e no acrossoma.

**Tabela 1** Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade de roedores.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Ratinhos CF-1</b>	7 semanas	0,25% e 0,5% $Pb(CH_3COO)_2$ em água	6 semanas	0.25%- diminuição do número de espermatozóides no epidídimo; Ausência de alterações de peso do testículo; 0.5%- diminuição da motilidade e do número de espermatozóides no epidídimo; aumento da percentagem de espermatozóides com morfologia anormal; Diminuição do peso do corpo e do epidídimo, mas não do testículo.	Wadi e Ahmand (1999)
<b>ICR-CD1</b>	2 meses	74 mg $PbCl_2$ /kg pc por injeção subcutânea	1, 2, 3 e 32 dias após a injeção do $PbCl_2$	Após 3 dias de exposição: Diminuição do número de espermatozóides no epidídimo; Aumento da percentagem de espermatozóides imóveis e com acrossoma intacto; diminuição do peso corporal; Aumento do peso do testículo; diminuição do diâmetro dos tubos seminíferos.	Graça et al (2004)
<b>NMRI</b>	8 semanas	0,06% $PbCl_2$ em água	16 semanas	Diminuição da condensação da cromatina nos espermatozóides da cabeça do epidídimo; Aumento da condensação da cromatina nos espermatozóides da cauda do epidídimo/vaso deferente. O Pb acumula-se no núcleo dos espermatozóides, diminuindo a descondensação da cromatina.	Hernandez-Ochoa et al (2006)
<b>NMRI</b>	9 semanas	1 g/L $PbCl_2$ em água	16 semanas	Aumento da estabilidade da condensação da cromatina.	Johansson e Pellicciari (1988)

**Tabela 1** continuação.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>NMRI</b>	9 semanas	1 g/L PbCl <sub>2</sub> em água	16 semanas	Reação acrossômica prematura	Johanson (1989)
	A partir do 1º dia de vida intra-uterina	0.5% Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> em água	Até ao 60º dia após nascimento	Não se observaram alterações no número de espermatozóides ou na morfologia; aumento da acumulação de Pb no sangue; redução do peso corporal, do testículo e do epidídimo; ausência de alterações na espermatogénese.	Pinon-Lataillade (1995)
<b>Swiss</b>	9-10 semanas	100 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc numa única injeção i.p.	Sacrifícios semanais até 8 semanas	Diminuição do número de espermatozóides; aumento da % de espermatozóides anormais; aumento dos níveis de peroxidação lipídica no testículo.	Acharya et al (2003)
	9-10 semanas	10 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc por injeção ip	Sacrifícios nos 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas após a administração do Pb	Diminuição do número de espermatozóides; aumento da % de espermatozóides anormais; redução do peso testículo.	Mishra e Acharya (2004)
<b>Ratos Druckrey</b>	28 dias	5, 10 e 20 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg oralmente	2 semanas	Aumento da acumulação de Pb nos testículos dos ratos injectados com as doses mais elevadas; ausência de alterações do peso e na histologia dos testículos; aumento da % de apoptose das células germinativas.	Adhikari et al (2001)
	adultos	5 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc por injeção ip	Diariamente durante 16 dias	Não se observaram alterações no número de espermatozóides no epidídimo, nem na sua motilidade.	Murthy et al (1995)

**Tabela 1** continuação.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Portran</b>	8 semanas	10, 50, 200 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc oralmente	3 meses	Várias lesões histopatológicas no testículo: vacuolização do epitélio; células imaturas no lúmen dos tubos; deslocamento de células; enrugamento da membrana basal.	Batra et al (2001)
<b>Sprague-Dawley</b>	7 semanas	10 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc por injeção ip	Semanalmente durante 6 ou 9 semanas	Diminuição da concentração e da % de espermatozóides móveis nos animais tratados com Pb durante 9 semanas.	Hsu et al (1997)
	100-120g	20 or 50 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc por injeção ip	Uma vez por semana durante 6 semanas	Diminuição do número e da motilidade dos espermatozóides do epidídimo nos animais injectados com 50 mg; diminuição do número de espermatozóides móveis nos animais injectados com 20 e 50 mg; aumento da % de capacitação nos animais administrados com 20 e 50 mg; aumento da % de reacção acrossómica nos animais administrados com 50 mg.	Hsu et al (1998)
	90 dias	0.3% Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> em água ou 5 mg óxido de Pb/m <sup>3</sup> por inalação	70 dias	Não se observaram alterações no número de espermatozóides, % de móveis ou morfologia; aumento da acumulação de Pb no sangue; ausência de alterações no peso do corpo, do testículo e do epidídimo; ausência de alterações histológicas no testículo.	Pinon-Lataillade et al (1993)
	90 dias + 1 semana de adaptação	8 mg Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> /kg pc por injeção ip	5 dias por semana durante 5 semanas	Não se observaram alterações no número de espermatozóides, motilidade ou morfologia;  Aumento da acumulação de Pb no sangue; ausência de alterações no peso do testículo; diminuição do peso corporal e do epidídimo; ausência de alterações no diâmetro tubular; diminuição do volume intertubular.	Thoreux-Manlay (1995)

## 1.4 Efeitos do cádmio na fertilidade

O cádmio é um metal pesado amplamente utilizado em processos industriais como a galvanização, produção de ligas metálicas, baterias, tintas e plásticos (ATSDR, 1999b; Waisberg et al, 2003).

A exposição aguda ao cádmio ocorre sobretudo nos locais de trabalho por inalação de fumos, poeiras ou, ocasionalmente, por ingestão. A população em geral está normalmente sujeita a exposição crónica por ingestão de alimentos ou água contaminada ou por inalação. (Robards e Worsford, 1991 para revisão). O consumo de tabaco é uma das vias de exposição ao cádmio mais frequentes para a população em geral, sobretudo devido à contaminação dos solos em que a planta do tabaco é cultivada. Estudos recentes mostram que a concentração de cádmio nas folhas do tabaco pode variar entre 0 e 6,78 µg/g de peso seco (Lugon-Moulin et al, 2006). Cada cigarro pode conter 1 a 2 µg de cádmio e cerca de 40 a 60% do cádmio presente no fumo inalado passa pelo epitélio pulmonar para a circulação sistémica (ATSDR, 1999b).

O cádmio tem a agravante de não ser biodegradável e de apresentar um período de semi-vida biológico bastante elevado (Robards e Worsford, 1991). Nos anos 30 do século passado, o cádmio foi associado à doença de Itai-Itai no Japão, que consistia em osteomalácia e osteoporose, devido à acumulação de cádmio nos ossos (Järup, 2002). O cádmio é acumulado sobretudo no fígado e no rim, contudo, os efeitos tóxicos manifestam-se em vários órgãos, nomeadamente no pulmão, na próstata e na bexiga (IARC, 1993; National Toxicology Program, 2005).

Vários autores relacionam a diminuição da fertilidade masculina com a exposição ocupacional ao cádmio (eg Ragan e Mast, 1990). Tem-se verificado também uma relação entre a presença de cádmio no plasma seminal, o declínio da qualidade espermática e danos oxidativos nos espermatozóides (Xu et al, 2003).

A Tabela 2 mostra os efeitos da exposição ao cloreto de cádmio na fertilidade de roedores. Vários estudos *in vivo* têm mostrado que o cádmio produz lesões testiculares em várias espécies, sendo, no entanto os roedores particularmente afectados pela acção deste metal (eg Nordberg, 1971; Aoki e Hofer, 1978). Por exemplo, este metal induz um aumento da permeabilidade do endotélio vascular com consequente edema no espaço intersticial dos tubos seminíferos do rato (Aoki e Hoffer, 1978; Gouveia; 1988). As lesões nos tubos seminíferos resultam de vazamento dos vasos sanguíneos, causando um aumento da pressão intratesticular conduzindo à isquémia dos tecidos (Aoki e Hoffer, 1978). Por outro lado, estudos realizados por Wong e colaboradores (2004) indicam que o cádmio induz alterações na barreira hemato-testicular (BHT) antes de induzir lesões vasculares. Os efeitos do cádmio na BHT estão bem documentados na literatura (eg Hew et al, 1993; Chung e Cheng, 2001; Cheng e Mruk, 2002). Hew e colaboradores (1993) propõem que o cádmio promove a desorganização dos microfilamentos das junções de oclusão entre as células de Sertoli. Estudos mais recentes propõem que o cádmio induz uma redução da expressão da ocludina nas células de Sertoli (Chung e Cheng, 2001). As ocludinas são proteínas de membrana das junções de oclusão e participam na selagem intercelular. As E-caderinas, responsáveis pela adesão celular, são moléculas dependentes do cálcio. Dado que o cádmio compete com o cálcio, as E-caderinas poderão também ser alvos do cádmio originando um rompimento na adesão intercelular, promovida por estas moléculas (Prozialeck, 2000).

Os estudos acerca dos efeitos tóxicos do cádmio em animais referem que o testículo é mais sensível à acção deste metal do que outros órgãos, nomeadamente o fígado ou o rim (Swiergosz-Kowalewska, 2001; Ren et al, 2003). Esta diferença poderá estar relacionada com o processo de destoxificação do cádmio os diferentes órgãos. As metalotioninas são pequenas moléculas ricas em cisteína que sequestram os metais e os acumulam, contribuindo assim para a inactivação e destoxificação



**Tabela 2** Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade de roedores.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Ratinhos Swiss Webster</b>	12 semanas	0,1 mg CdCl <sub>2</sub> /kg pc ip  1 injeção/dia durante 4, 10, 26 e 56 semanas	Sacrifício após os vários períodos de exposição	Acumulação de cádmio no fígado e nos testículos;  Os níveis de cádmio nos espermátides não ultrapassaram os 0,02 µg/g.	Bench et al (1999)
<b>Swiss OF-1</b>	12 semanas	0,015 g CdCl <sub>2</sub> /L oralmente	1, 3, 6 e 12 meses com período de recuperação de 3 a 6 meses	Aumento da acumulação de cádmio nos testículos com a duração da exposição;  Diminuição dos níveis de acumulação durante o período de recuperação;  Não observaram diferenças no peso corporal;  Diminuição do peso testicular absoluto e relativo e do diâmetro máximo para os períodos de exposição mais longos;  Diminuição do número e células de Leydig no espaço intersticial;  Diminuição do volume intersticial;  Aumento do diâmetro dos tubos seminíferos.	Blanco et al (2007)
<b>Ratos CD</b>	300-400 g	3 µM CdCl <sub>2</sub> / 100 g pc ip	Sacrifício 0; 1; 2,5 e 4 horas depois	Edema intersticial;  Oclusão vascular;  Infiltração sanguínea nos espaços linfáticos;  Ruptura do epitélio germinal;  Descamação de células para o lúmen.	Aoki e Hoffer (1978)

**Tabela 2** continuação.

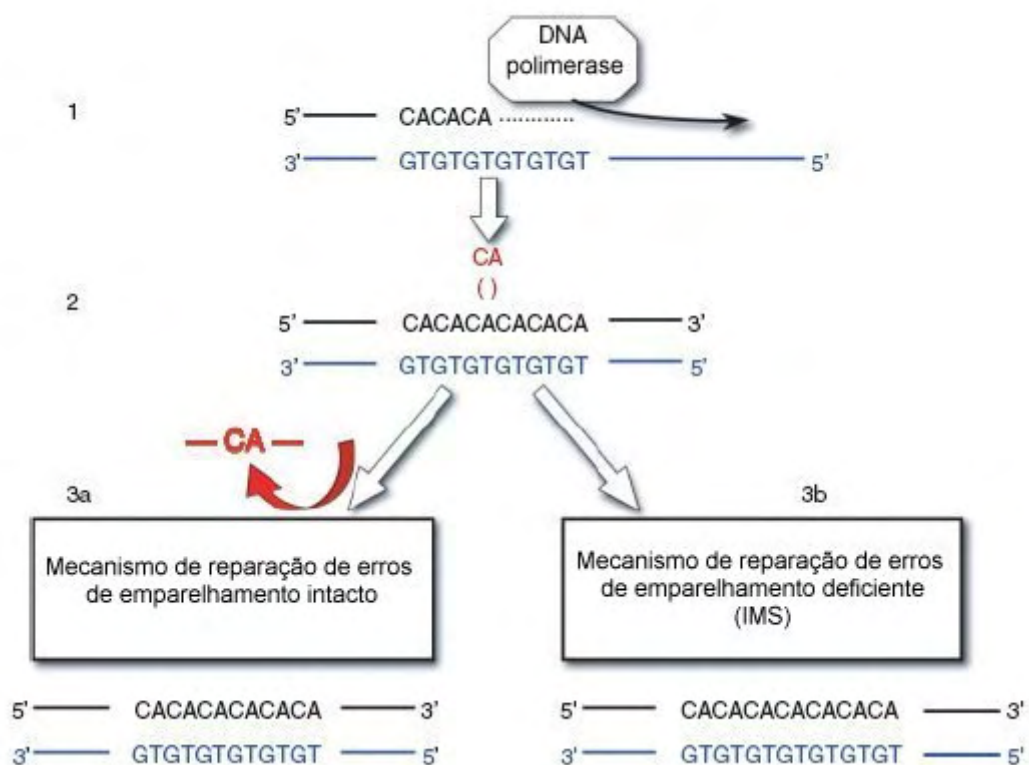
Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Srage-Dawley</b>	120-130 g	5 mg CdCl <sub>2</sub> /kg pc Oralmente durante 30 dias		Diminuição da concentração de espermatozóides; Diminuição da motilidade dos espermatozóides; Diminuição do peso dos testículos e epidídimos; Aumento da % de espermatozóides mortos e com morfologia anormal.	El-Demerdash et al (2004)
	10 semanas	0; 0,5; 1 mg CdCl <sub>2</sub> /kg pc ip	Sacrifício 4, 24, 48 e 72 horas após a injeção	Não se observaram lesões vasculares nos testículos; Na dose de 1mg/kg observou-se uma falha na espermição no estadio IX da espermatogénese para os seguintes, no epitélio seminífero.	Hew et al (1993)
	180-200 g	0, 1, 2, 4, 8 mg/kg Cd em 0,5 mL CdCl <sub>2</sub>	Sacrifício 1 semana depois	Diminuição do peso testicular para doses superiores a 1 mg. Histologia: 1 mg: sem alterações; 2 mg: infiltrações de células inflamatórias no espaço intersticial; focos de necrose nos tubos seminíferos; 4 mg: morte das células espermatogénicas; presença de fibroblastos e células inflamatórias no espaço intersticial. FCM: 2 mg: diminuição da % de células sub-haplóides e haplóides; aumento da % de diplóides e tetraplóides.	Yang et al (2006)

desses metais (Klaassen et al, 1998). O cádmio apresenta elevada afinidade para as metalotioninas, sendo particularmente eficiente na indução de produção de metalotioninas no fígado (Ren et al, 2003). O testículo, por sua vez, apresenta menor capacidade de produção de metalotioninas (Ren et al, 2003), o que, possivelmente, explica a maior sensibilidade ao cádmio. No entanto, Liu e colaboradores (2001) concluíram que a diferente susceptibilidade à toxicidade do cádmio se deverá ao perfil genético de cada indivíduo e não a diferentes níveis de metalotionina nos tecidos. A sensibilidade testicular à toxicidade do cádmio também varia muito entre as várias estirpes de ratinhos. As estirpes AJ e C3H/HEJ são consideradas resistentes ao cádmio, enquanto que as estirpes 129J, DBA/2J e CD1 são consideradas sensíveis (Nolan e Shaikh, 1986). A resistência à toxicidade induzida pelo cádmio no testículo foi também associada à presença de um gene autossómico recessivo, designado *Cdm*, localizado no cromossoma 3 no ratinho (Dalton et al, 2000).

Uma das vias de entrada do cádmio nas células é efectuada através dos transportadores de iões divalentes, nomeadamente, o DMT1 que transporta uma grande variedade de iões metálicos incluindo o  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e o  $\text{Pb}^{2+}$  (Gunshin et al, 1997). Recentemente, Dalton e colaboradores (2005) identificaram uma proteína transportadora iónica específica, a ZIP8, codificada pelo gene *Slc39a8*, que facilita a acumulação de cádmio no endotélio vascular do testículo. Esta proteína é expressa nas células do endotélio vascular do testículo nas estirpes sensíveis, mas está ausente nas estirpes resistentes (Dalton et al, 2005).

O cádmio é considerado um agente carcinogénico para os humanos pela International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 1993). Contudo, o cádmio apresenta uma actividade genotóxica directa muito baixa, ou seja, não induz danos directos no DNA. Foi sugerido que o cádmio induz carcinogénese por outras vias, nomeadamente, por alterações na regulação génica, indução de stress oxidativo, ruptura das caderinas, interferência com a apoptose e inibição da reparação do DNA (Waisberg et al, 2003).

Os microssatélites são sequências curtas de DNA repetidas em tandem que se encontram distribuídas por todo o genoma eucariota. A replicação destas repetições é propensa a erros devido ao deslizamento da polimerase do DNA durante a síntese, criando "loops" de inserção/delecção. A reparação destes "loops" é realizada pelas proteínas de reparação de erros de emparelhamento de bases de DNA ("DNA mismatch repair") (Peltomäki, 2001). A ausência de reparação de erros de emparelhamento resulta em ganhos ou perdas de repetições de dinucleótidos nos microssatélites, originando um fenótipo designado Instabilidade de Microssatélites (IMS) (Figura 10), considerado um marcador de elevado risco de cancro (Söreide et al, 2006).



**Figura 10** Mecanismo da instabilidade de microssatélites (IMS). 1) Replicação do DNA; 2) Inserção de uma repetição CA na cadeia de replicação. Este erro é reparado pelas enzimas de reparação de erros de emparelhamento (3a) ou o erro não é reparado causando IMS (3b). A: adenina, C: citosina, G:guanina, T:timina. Adaptado de Söreide et al (2006).

Estudos recentes mostram que as proteínas que participam nos sistemas de reparação do DNA, em especial na reparação por excisão e por reparação de erros de emparelhamento, são sensíveis ao cádmio (Jin et al, 2003; Giaginis et al, 2006). Assim, pode ocorrer instabilidade dos microssatélites em consequência da menor actividade das proteínas responsáveis pela reparação de erros de emparelhamento (McMurray e Tainer, 2003). Neste contexto, torna-se importante avaliar se o cádmio induz IMS no testículo do ratinho.

## **1.5 Efeitos do crómio na fertilidade**

O crómio (Cr) pode ser encontrado no solo, nas rochas, nos animais e nas plantas (ATSDR, 2000). Os três principais estados oxidativos do crómio, e os mais comuns a nível ocupacional e no ambiente em geral, são o Cr(0), o Cr(III) e o Cr(VI) (Zhitkovich, 2005). O crómio(0) é uma forma de crómio metálico, produzido industrialmente, é um sólido com elevado ponto de fusão e é geralmente usado no fabrico de aço e outras ligas metálicas. Os compostos de Cr(III) e Cr(VI) são muito utilizados a nível industrial em processos de cromagem, soldadura, curtimento de peles, fabrico de corantes, preservação de madeiras, entre outros (ATSDR, 2000).

O Cr(III) ocorre naturalmente no ambiente e é um micronutriente essencial, com um papel importante no metabolismo da glucose, das proteínas e das gorduras, como potenciador da acção da insulina (ATSDR, 2000). Os compostos de Cr(VI) são produzidos industrialmente e são considerados carcinogénicos para o homem (Ding e Shi, 2002; Chiu et al, 2004).

O Cr(III) entra nas células muito lentamente por difusão simples ou fagocitose, devido à sua conformação predominantemente octaédrica (ATSDR, 2000). Por outro lado, o Cr(VI), na forma de oxanião cromato tetraédrico ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), atravessa a membrana celular usando um transportador não específico, o sistema permease, que transporta outros aniões com configuração tetraédrica como o  $\text{SO}_4^{2-}$  e o  $\text{PO}_4^{2-}$  (Belagyi et al, 1999). Uma vez

no interior da célula, o Cr(VI) é rapidamente reduzido à forma de Cr(III), mais estável, pelos redutores celulares como o ascorbato, a cisteína e a glutatona (Zhitkovich, 2005). Durante este processo de redução do Cr(VI), são geradas outras espécies de crómio, mais instáveis, nomeadamente Cr(V) e Cr(IV). Enquanto que o Cr(VI) é pouco reactivo com os ácidos nucleicos, as espécies de Cr(V), Cr(IV) e Cr(III) são muito reactivas com o DNA (Stearns et al, 1995). O processo de redução do crómio(VI) envolve ainda a formação de espécies reactivas de oxigénio, nomeadamente o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), em reacções do tipo Fenton ou Haber-Weiss (Shi et al, 1999). Como resultado da redução do crómio e da consequente acumulação intracelular do Cr(III), são originadas várias lesões genéticas, quer por interacção directa do crómio com o DNA ou indirectamente por via das espécies reactivas de oxigénio. Assim, o processo de redução do crómio(VI) pode originar aductos Cr-DNA, "crosslinks" DNA-proteína, "crosslinks" DNA-DNA, quebras de cadeia simples ("single strand breaks"), ou oxidação das bases, concretamente da guanina, com formação de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (Shi et al, 1999; O'Brien et al, 2003). Estas lesões genéticas podem induzir morte celular por apoptose, bem como alterações no ciclo celular (O'Brien et al, 2003 para revisão).

A exposição a Cr(VI) está associada ao aparecimento de vários tipos de cancro, nomeadamente, do pulmão, do rim, da bexiga e da próstata (Costa e Klein, 2006 para revisão). Estudos em animais referem também lesões histopatológicas no rim (Oliveira et al, 2006), no fígado (das Neves et al, 2002), e no baço (das Neves et al, 2001).

O homem pode estar exposto a elevados níveis de crómio em determinadas situações ocupacionais ou ambientais. Nos estudos epidemiológicos, realizados com trabalhadores expostos ao crómio, a relação entre a exposição a crómio e alterações na função reprodutiva masculina parece ser, até ao momento, inconclusiva (Figà-Talamanca et al, 2001). Por exemplo, Bonde e Ernst (1992) avaliaram a qualidade do sêmen, bem como os níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) e de testosterona em trabalhadores (soldadores) expostos ao crómio hexavalente, não tendo, contudo, chegado a nenhuma relação conclusiva entre os níveis de crómio no sêmen e urina e a

qualidade do sêmen ou dos níveis hormonais. Mais tarde, Figà-Talamanca e colaboradores (2000) estudaram os efeitos de metais (em especial o níquel e o crómio) na fertilidade de trabalhadores de uma fábrica de cunhagem, e os dados obtidos não excluem a hipótese de a exposição a fumos poder estar associada ao aumento do período até à obtenção de uma gravidez ("Time to Pregnancy-TTP"). Num estudo efectuado com trabalhadores da área da electrodeposição, Li e colaboradores (2001) detectaram uma diminuição do número e da motilidade dos espermatozóides. Este estudo contradiz um outro anterior no qual não foram encontradas quaisquer alterações na qualidade do sêmen de operários de soldadura (Hjollund et al, 1998).

Mais recentemente, os estudos de Kumar e colaboradores (2005) em trabalhadores responsáveis pela produção de sulfato de crómio mostraram uma correlação positiva entre a concentração de crómio no sangue e a percentagem de espermatozóides anormais. Contudo, outros aspectos como o volume de sêmen, o tempo de liquefacção, o pH, a viabilidade espermática, a concentração e a motilidade não foram afectados (Kumar et al, 2005).

A Tabela 3 apresenta uma compilação dos efeitos do crómio na fertilidade de roedores. Alguns destes estudos experimentais apontam para a existência de toxicidade do crómio, em particular do Cr(VI), ao nível do testículo. Relativamente aos efeitos na função espermática, os estudos em animais mostraram que a percentagem de espermatozóides com morfologia anormal geralmente aumenta em ratinhos (Acharya et al, 2004; 2006) e em ratos expostos a trióxido de crómio (Li et al, 2001). Um outro parâmetro geralmente afectado pela exposição ao crómio é a concentração espermática, que geralmente diminui após a exposição ao crómio. Este efeito foi observado em ratinhos (Acharya et al, 2004; 2006) e em ratos expostos a CrO<sub>3</sub> (Li et al, 2001) e também em coelhos (Yousef et al, 2006) e macacos Bonnet expostos a dicromato de potássio (Subramanian et al, 2006).

Estudos anteriores mostraram também o efeito adverso de um composto de crómio num estado de oxidação intermediário, nomeadamente

**Tabela 3** Efeitos do cromato de potássio na fertilidade de roedores.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Ratinhos</b> <i>ICR-CD1</i>	60 dias	[CrV-BT] <sup>2-</sup> 8 µmol de Cr/ratinho, durante 5 dias	Sacrifício após 24 h	Diminuição da integridade do acrossoma; Alterações no epitélio seminífero, com esfoliação de células para o lúmen dos tubos seminíferos. Necrose e vacuolização de células germinativas.	Pereira et al (2005)
<b>Swiss Albino</b>	9-10 semanas	10mg CrO <sub>3</sub> /kg pc ip	Sacrifício 5-8 semanas após a injeção	Diminuição da concentração de espermatozóides; Aumento da % de espermatozóides com formas anormais.	Acharya et al (2004)
<b>Swiss Albino</b>	10 semanas	1mg CrO <sub>3</sub> /kg pc ip	Sacrifício 5-8 semanas após a injeção	Aumento da peroxidação lipídica; Aumento da % de espermatozóides com formas anormais; Diminuição da concentração de espermatozóides; Diminuição dos níveis de ácido ascórbico; Diminuição da actividade da catalase, peroxidase e da SOD.	Acharya et al (2006)
<b>Ratos</b> <i>Male Wistar</i>	100-120 dias	1, 2 e 4 mg Cr(III) ou Cr(VI)/kg pc ip durante 5 dias consecutivos	Sacrifício 7 e 60 dias após a última administração	Menor aumento de peso nos animais tratados com Cr(III) e Cr(VI); Ausência de alterações histopatológicas nos ratinhos sacrificados após 7 dias; Nos ratinhos sacrificados após 60 dias: Diminuição do peso do testículo nos ratinhos expostos a Cr(VI); Atrofia dos tubos seminíferos; Perda de epitélio germinativo; Alterações na organização testicular ; Atrofia das células de Leydig.	Ernst (1990)



**Tabela 3** Continuação.

Modelo animal	Idade	Dosagem	Duração	Efeitos observados	Referência
<b>Sprague Dawley</b>	100-120 dias	0,5 mg Na <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> /kg pc 5 dias por semana durante 8 semanas	Um grupo experimental foi sacrificado no final da exposição e um outro foi sacrificado após 8 semanas (sem exposição)	O grupo sacrificado após a exposição apresentou: Diminuição da motilidade dos espermatozóides; Não se observaram alterações na morfologia dos espermatozóides; O grupo sacrificado após 8 semanas apresentou: Ausência de alterações na motilidade dos espermatozóides.	Ernst e Bonde (1992)
	60 dias	0, 10 e 20 mg CrO <sub>3</sub> /kg /dia Administrado oralmente durante 6 dias	Sacrifício após 6 semanas	Diminuição do número de espermatozóides; Aumento da % de espermatozóides com formas anormais; Diminuição do diâmetro dos tubos seminíferos; Alterações no epitélio seminífero.	Li et al (2001)
	200 g	0,2 mg; 0,4 e 0,6 mg K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> /kg pc /dia durante 13 ou 26 dias	Sacrifício 24 horas após a última administração	Menor aumento de peso nos ratos tratados com K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; Diminuição do peso do testículo nos animais expostos a 0,6 mg de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (26 dias); Redução do diâmetro dos tubos seminíferos nos animais expostos a 0,4 mg (26 dias) e 0,6 mg de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (13 e 26 dias); Esfoliação de células do epitélio germinativo nos animais expostos a 0,6 mg (26 dias); Desintegração de espermatócitos, necrose tubular e degenerescência de células de Leydig nos animais expostos a 0,4 mg e 0,6 mg de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; Diminuição da actividade da catalase e da SOD no testículo nos animais expostos a 0,4 mg e 0,6 mg de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; Aumento da peroxidação lipídica no testículo.	Chandra et al (2007)

Cr(V), no epitélio seminífero e também na função espermática de ratinhos (Pereira et al, 2002; 2004; 2005).

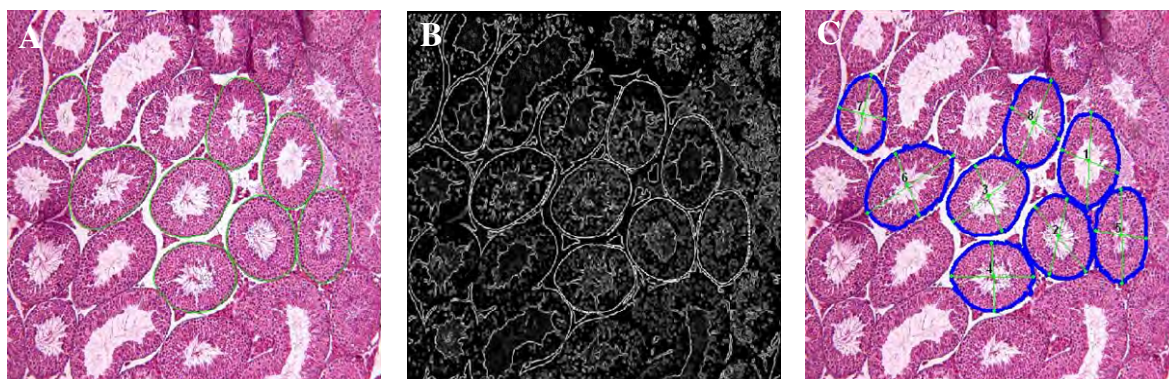
## **1.6 Estudos morfométricos do testículo**

As alterações no diâmetro dos tubos seminíferos constituem um importante efeito histopatológico da toxicologia testicular e, como tal, é fundamental que o diâmetro dos tubos seminíferos seja avaliado nos estudos de toxicologia testicular (Lanning et al, 2002).

A contracção dos tubos seminíferos pode ocorrer em consequência da depleção de células germinativas, ou como resultado da redução da secreção de fluido pelos tubos seminíferos. Por outro lado, a dilatação tubular pode ocorrer como resultado do aumento do volume do fluido luminal (Creasy, 2001; Lanning et al, 2002).

O diâmetro tubular é tradicionalmente avaliado utilizando a ocular micrométrica ao microscópio óptico. Contudo, esta metodologia está sujeita a erros sistemáticos por parte do avaliador. Para ultrapassar este problema, foi desenvolvido pelo nosso grupo de investigação e em colaboração com o Instituto de Engenharia Electrónica e Telemática de Aveiro (IEETA), um programa informático denominado Snakes que, com base em morfologia matemática, análise estatística e modelos deformáveis ("snakes"), permite calcular com exactidão o diâmetro tubular (Guevara et al, 2003).

Esta nova abordagem tem por base uma série de operações de modo a aumentar o contraste das imagens, seguida da aplicação de um detector de limites, de modo a obter uma aproximação aos contornos dos tubos. Os modelos deformáveis são então aplicados, permitindo assim a definição final dos contornos dos tubos seminíferos (Guevara et al, 2003). A Figura 11 exemplifica as várias etapas do processamento das imagens: snakes inicial, pré-processamento e snakes final.



**Figura 11** Exemplo de uma aplicação do programa de medição do diâmetro dos tubos seminíferos Snakes: (A) snakes inicial, (B) imagem pré-processada (C) snakes final.

## 1.7 Selecção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite, com grande rapidez e sensibilidade, analisar qualitativamente diferentes tipos de células. Entre vários parâmetros funcionais/estruturais, a citometria de fluxo permite avaliar o conteúdo em DNA de várias subpopulações celulares numa população mista. Esta avaliação é feita com base em histogramas de intensidade de fluorescência que permitem a identificação das células com diferentes níveis de ploidia num determinado tecido (Spanò et al, 1993; 1996).

A citometria de fluxo foi aplicada ao estudo dos efeitos tóxicos de várias substâncias na espermatogénese de diferentes espécies, nomeadamente no ratinho (Jagetia et al, 1996; Spanò et al, 1996; Oskam et al, 2004) no rato (Sutter et al, 1997; Blake et al, 2004) e no hamster dourado (Golan et al, 2000). As alterações nas percentagens das células germinativas são respostas frequentes à acção de substâncias químicas, como por exemplo a vinblastina (Jagetia et al, 1996), o sulfato de vinedina (Jagetia et al, 1997), o diepoxibutano (Spanò et al, 1996) ou o ácido metoxiacético (Sutter et al, 1997).

Em todos os casos acima referidos, as análises por citometria de fluxo foram realizadas em células isoladas a partir de material fresco. As

metodologias utilizadas para o isolamento de núcleos são bastante variadas e incluem a digestão com pepsina a 0,1% (Spanò et al, 1996), digestão com tripsina e DNase (Sutter et al, 1997) e dissecação do testículo em tampão TNE (0,01M tampão Tris, 0,15M NaCl, 0,01M EDTA a pH 7.4) (Golan et al, 2000). Outros autores, prepararam os núcleos para análise por citometria de fluxo utilizando o ácido cítrico como solução detergente (Otto, 1992). Todavia, a necessidade de utilização de material fresco pode condicionar uma utilização mais abrangente da citometria de fluxo neste género de estudos. Na maioria dos laboratórios de toxicologia, a avaliação histológica dos tecidos e órgãos é feita rotineiramente e geralmente inclui a inclusão das amostras em parafina.

Neste trabalho, foi avaliada a possibilidade da utilização da citometria de fluxo para analisar células do testículo de ratinho em amostras incluídas em parafina. Esta técnica foi desenvolvida por Hedley e colaboradores (1983) para avaliar o conteúdo em DNA em amostras tumorais, e desde essa altura tem vindo a ser aplicada rotineiramente ao nível da oncologia clínica. Assim, o desenvolvimento de um protocolo de citometria de fluxo para análise de células de testículo, em particular nos casos em que a espermatogénese é afectada, pode ser um contributo importante no campo da toxicologia reprodutiva.

Com este trabalho pretendia-se demonstrar que em alternativa à utilização de material fresco, as amostras de testículo incluídas em parafina poderiam ser utilizadas para determinar com precisão os níveis de ploidia das células germinativas, usando a citometria de fluxo. A validação de amostras parafinadas para análise das células do testículo por citometria de fluxo foi feita por comparação dos resultados obtidos para o material fresco. O protocolo validado foi posteriormente utilizado para avaliar os efeitos tóxicos do cloreto de chumbo, do cloreto de cádmio e do cromato de potássio na espermatogénese do ratinho.

## 1.8 Enquadramento e objectivos do trabalho

Este trabalho de doutoramento foi integrado no Projecto I&D CTS/22, financiado pela Universidade de Aveiro, intitulado: -"Técnicas de Diagnóstico Tradicionais e Inovadoras na Biomonitorização da Fertilidade Masculina".

Dada a grande actualidade do problema da infertilidade e sendo o factor masculino responsável por cerca de 50% dos casos (Bhasin et al, 1994; de Kretser e Baker, 1999), considerou-se pertinente o estudo da fertilidade masculina. Uma vez que a exposição a metais pesados é reconhecida como sendo uma importante causa da redução da fertilidade masculina, decidiu-se estudar neste trabalho o efeito de três compostos de metais pesados (cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio), usando como modelo ratinhos machos da estirpe ICR-CD1. Para cada um dos compostos foram seleccionadas várias doses, sendo os animais expostos durante um curto período de tempo e os efeitos avaliados imediatamente após a exposição (24 horas) e após um ciclo espermatogénico (35 dias).

Como indicadores da toxicidade dos vários compostos fez-se uma análise compreensiva de vários parâmetros dos órgãos reprodutores (testículo e epidídimo) e dos espermatozóides.

Os objectivos deste trabalho consistiram em:

1. Aplicar, desenvolver e aperfeiçoar técnicas de diagnóstico de fertilidade em estudos de toxicologia reprodutiva em ratinhos.
2. Avaliar os efeitos de três compostos de metais pesados (cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio) na fertilidade do ratinho através de:
  - Estudos histológicos do testículo e do epidídimo.
  - Efeitos na espermatogénese.
  - Aspectos funcionais e genéticos dos espermatozóides.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

## 2.1 Químicos

O iodeto de propídio (IP), a rodamina 123 (Rh123), a glucose, o ácido 2-(4-(2-hidroxietilo)-1-piperazinilo)etano-sulfónico (HEPES), o dimetilsulfóxido (DMSO), o Tris-HCl, o EDTA, a albumina de soro bovino (BSA), o Triton X-100 e o "Coomassie blue" foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, EUA). O "LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit" (inclui o SYBR-14 e o IP para o ensaio da viabilidade) e a laranja de acridina (LA) foram adquiridos à Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). O  $K_2CrO_4$ , NaCl, KCl,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $NaHCO_4$ ,  $CaCl_2$  foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O "In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" e a DNase I foram fornecidos pela Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha).

## 2.2 Animais

Foram usados ratinhos da estirpe ICR-CD1 com 8 semanas de idade, fornecidos pela Harlan Interfaun Ibérica SA, Barcelona, Espanha. Os animais foram mantidos em gaiolas de polycarbonato transparente em câmaras climatizadas "Flufrance A130 SN Rech" com temperatura de  $22 \pm 2^\circ C$ , humidade relativa de 40-60% e fotoperíodo de 12h/dia.

O alimento (ração "Panlab AO4", Panlab, Barcelona, Espanha) e a água foram fornecidos *ad libitum*. Os animais permaneceram durante 1 semana antes da utilização experimental para se ambientarem às condições acima referidas.

Os ratinhos foram divididos em grupos para administração de vários compostos metálicos como se descreve a seguir.

## **2.3 Exposição a cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio**

Nos ensaios do cloreto de chumbo, foram constituídos 3 grupos de 10 animais cada, que foram injectados subcutaneamente com 74 e 100 mg de  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e 0,9% NaCl (grupo controlo), respectivamente, durante quatro dias consecutivos, tal como esquematizado na Tabela 4.

Nas experiências com o cloreto de cádmio, foram constituídos 4 grupos de 10 animais cada, que foram injectados subcutaneamente com uma única dose de 1, 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  e 0,9% NaCl (grupo controlo), respectivamente, tal como representado na Tabela 4.

Nos ensaios com o cromato de potássio, foram constituídos 3 grupos de 10 animais cada, que foram injectados subcutaneamente com 5 e 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$  e 0,9% NaCl (grupo controlo), respectivamente, durante quatro dias consecutivos, tal como esquematizado na Tabela 4.

Nos ensaios do cloreto de chumbo e do cromato de potássio, um grupo de animais exposto a cada uma das condições acima descritas ( $n=5$  em cada grupo) foi sacrificado por estiramento cervical 24 horas após a última administração, ou seja, 5 dias após o início da experiência. Os restantes animais foram sacrificados após 35 dias ( $n=5$  em cada grupo) (Tabela 4). Relativamente aos ensaios com o cloreto de cádmio, um grupo de animais expostos a cada uma das condições referidas foi sacrificado 24 horas e 35 dias após a administração dos compostos ( $n=5$  em cada grupo) (Tabela 4).



**Tabela 4** Representação dos protocolos de administração dos compostos e dos sacrifícios dos animais. ✓: injeção; X: sacrifício. Para todos os grupos foi utilizado um n=5.

		Dias						
	Dose (mg/kg pc)	1	2	3	4	5	...	35
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	0(Controlo)	✓	✓	✓	✓	X		X
	74	✓	✓	✓	✓	X		X
	100	✓	✓	✓	✓	X		X
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	0(Controlo)	✓	X					X
	1	✓	X					X
	2	✓	X					X
	3	✓	X					X
<b>K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub></b>	0(Controlo)	✓	✓	✓	✓	X		X
	5	✓	✓	✓	✓	X		X
	10	✓	✓	✓	✓	X		X

## 2.4 Análise das alterações induzidas pelo cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio no testículo e epidídimo do ratinho

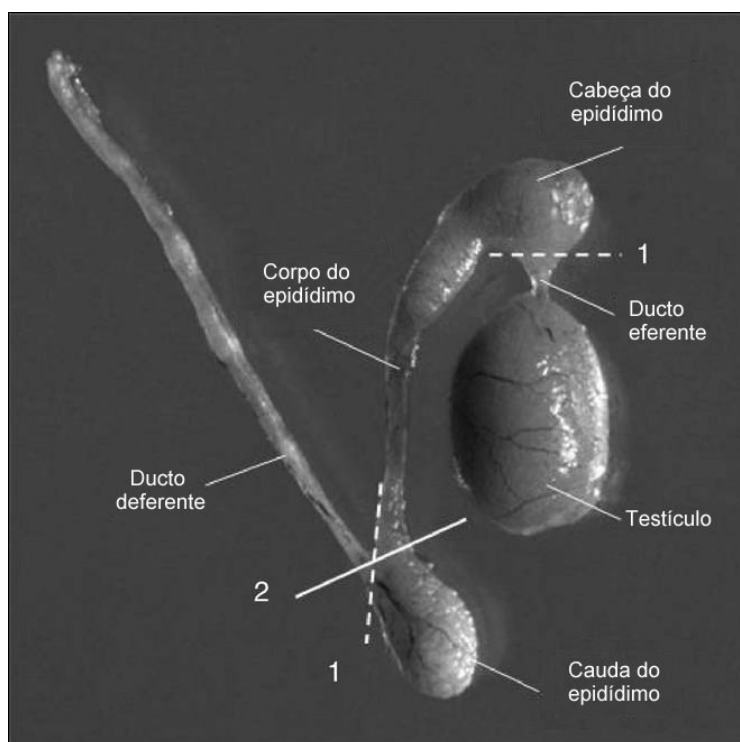
Para a avaliação do efeito dos metais no testículo e epidídimo dos ratinhos foi feita a sua análise histológica, fez-se ainda a quantificação dos níveis de metais no testículo e nos animais administrados com cloreto de cádmio avaliou-se a instabilidade dos microssatélites, também neste órgão.

Foram ainda desenvolvidas outras técnicas complementares que permitiram fazer uma avaliação mais completa dos efeitos do cloreto de chumbo, do cloreto de cádmio e do cromato de potássio no testículo do ratinho. As técnicas desenvolvidas neste trabalho incluíram a medição do diâmetro dos tubos seminíferos (secção 2.4.2.1), contribuindo assim para uma análise histológica mais completa e ainda a avaliação das percentagens dos

diferentes tipos celulares do testículo por citometria de fluxo, a partir de amostras previamente incluídas em parafina (secção 2.4.4).

#### 2.4.1 Sacrifício dos animais

Imediatamente após o sacrifício, os ratinhos foram pesados. Após a dissecação dos animais fez-se a recolha do testículo e epidídimo, como exemplificado na Figura 12, que seguidamente se pesaram e posteriormente processaram para análise histológica. No testículo foi ainda feita a quantificação dos níveis de metais por ICP-MS, análise de ploidias por citometria de fluxo e análise da instabilidade de microssatélites.



**Figura 12** Órgãos reprodutivos do ratinho. 1) Local de incisão para remoção do epidídimo, 2) Local de incisão para remoção da cauda do epidídimo. Adaptado de Tayama et al (2006).

#### 2.4.2 Análise histológica

Os testículos e epidídimos do lado direito dos animais foram fixados em solução de Bouin durante 24 horas e, seguidamente, desidratados numa série

crescente de etanol, impregnados e incluídos em parafina (Anexo 1). Seguidamente, foram efectuadas secções de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando um micrótomo Leitz 1512 (Leitz, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram colados em lâmina de vidro e após secagem procedeu-se à sua coloração com hematoxilina e eosina (Anexo 2).

Após desidratação e clareamento, as preparações foram montadas em resina sintética Eukitt® (EMS, Hatfield, EUA) e posteriormente observadas ao microscópio óptico (Olympus BX41, Japão). Os aspectos histológicos mais relevantes foram fotografados com máquina digital Olympus Camedia C-5060 (Olympus, Japão). Algumas das imagens serviram ainda para posterior estudo morfométrico dos tubos seminíferos.

#### ***2.4.2.1 Estudo morfométrico dos tubos seminíferos***

Para a avaliação morfométrica dos tubos seminíferos foram obtidas imagens de secções de testículo e, para cada uma delas, efectuou-se a selecção de alguns pontos no limite do contorno dos tubos seminíferos. Seguidamente, o programa Snakes fez algumas operações para aumentar o contraste e, em seguida, aplicou um detector de limites, de modo a obter uma aproximação aos contornos dos tubos. Os modelos deformáveis foram então aplicados, permitindo assim a definição final dos contornos dos tubos seminíferos. Os resultados foram armazenados num ficheiro do tipo html. De modo a calibrar este programa, efectuou-se a comparação entre as medições adquiridas com o Snakes com as obtidas através do sistema tradicional, ao microscópio óptico. Para tal, efectuou-se a medição do diâmetro dos tubos com uma ocular micrométrica, após calibração com micrómetro objectivo. Os tubos arredondados ou ligeiramente oblíquos foram medidos pelo seu menor eixo. Foram medidos 32 tubos seleccionados aleatoriamente em 3 lâminas de 3 animais diferentes.

#### **2.4.3 Quantificação dos níveis de metais nos testículos por ICP-MS**

Os teores em chumbo, cádmio e crómio nos testículos dos ratinhos administrados com estes metais, bem como os respectivos controlos, foram

quantificados por espectroscopia de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

As amostras de testículo foram mantidas a -20°C até à digestão, que se iniciou com a adição de ácido nítrico e aquecimento em placa a 150°C, durante 2 horas. Seguidamente, as amostras foram colocadas em forno microondas CEM 81D (CEM Corporation, Carolina do Norte, EUA) ajustado com uma unidade de exaustão e potência controlada. O programa de digestão no microondas está representado na Tabela 5.

Os elementos foram então analisados num espectrómetro de ICP-MS Thermo X-Series (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) com nebulizador de vidro. Foram analisados os isótopos  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ . Os limites de detecção para o Cd, Cr e Pb foram de 0,005 µg/L, 0,3 µg/L e 0,05 µg/L, respectivamente.

**Tabela 5** Programa de digestão das amostras em microondas.

Potência	Tempo
100%	3min
0%	3min
100%	3min
0%	3min
100%	3min
0%	3min
100%	3min
0%	3min
100%	3min

O processo de digestão e análise foi verificado com a medição do teor destes elementos num material de referência (NCS ZC73016 “Chicken meat”; LGC Promochem, Barcelona).

O teor em cada um dos elementos foi expresso em micrograma de elemento por grama de tecido fresco (µg/g pf).

#### **2.4.4 Análise do conteúdo em DNA das células do testículo em amostras parafinadas e em fresco por citometria de fluxo**

Foram utilizados diferentes protocolos para o isolamento de células do testículo do ratinho, quer para amostras a fresco ou incluídas em parafina. Para cada protocolo, foram utilizados pelo menos 4 testículos de diferentes ratinhos.

##### **2.4.4.1 Amostras em fresco**

Foram testados três protocolos diferentes de isolamento de células do testículo:

###### **2.4.4.1.1 Protocolo F1**

Os testículos foram dissecados em tampão TNE (0,01 M tampão Tris, 0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA, pH 7,4), de acordo com a metodologia descrita por Golan e colaboradores (2000). Após filtração por malha de nylon de 55 µm de diâmetro de poro, as suspensões foram suplementadas com glicerol a 10% (v/v) e armazenadas a -20°C até análise. As suspensões de núcleos foram posteriormente descongeladas, centrifugadas a 500 g durante 5 minutos e ressuspendidas em novo tampão TNE.

###### **2.4.4.1.2 Protocolo F2**

O Protocolo F2 foi baseado no descrito por Spanò e colaboradores (1996) para isolamento de núcleos de testículo de ratinho. Os testículos foram dissecados em Pepsina-HCl a 0,1%, a pH 1,8, durante 10 minutos. Após filtração, a suspensão monocelular foi fixada em etanol a 96° e mantida a - 20°C. Após descongelamento, as suspensões foram incubadas com pepsina-HCl 0,5% durante 10 minutos, centrifugadas a 500 g durante 10 min e ressuspendidas em PBS (Anexo 3).

###### **2.4.4.1.3 Protocolo F3**

O Protocolo F3 foi baseado no previamente descrito por Otto (1992). Os testículos foram dissecados em solução detergente (0,1 M ácido cítrico e

Tween 20 a 0,5% em água) com incubação durante 10 min à temperatura ambiente.

Após filtração numa malha de nylon de 55  $\mu\text{m}$ , a suspensão foi centrifugada a 300 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em PBS. A suspensão foi fixada em etanol a 70° e foi mantida durante vários dias. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada e o sedimento ressuspendido em solução detergente. Seguiu-se uma incubação durante 10 min à temperatura ambiente e finalmente adicionaram-se 5 volumes de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,4 M.

#### **2.4.4.2 Amostras parafinadas**

Foram testados dois protocolos de isolamento de núcleos a partir de amostras incluídas em parafina. Para ambos os protocolos efectuaram-se duas ou mais secções (espessura de 40  $\mu\text{m}$ ) de 5 blocos, correspondendo a 5 animais diferentes. Os cortes de parafina foram seguidamente desparafinados em xilol e re-hidratados.

##### **2.4.4.2.1 Protocolo P1**

No Protocolo P1, as amostras foram incubadas com ácido cítrico numa concentração de 2 mg/mL e pH 6,0 num banho térmico a 80°C. Em seguida fez-se uma digestão com pepsina a pH 1,5 a 37°C. As amostras foram depois lavadas com PBS (Hedley et al, 1983; 1989).

##### **2.4.4.2.2 Protocolo P2**

O Protocolo P2 foi em tudo semelhante ao protocolo P1, com excepção da lavagem com ácido cítrico que, neste caso, não foi efectuada (Mora et al, 1999).

#### **2.4.4.3 Análise por citometria de fluxo**

Em todos os protocolos, as amostras (F1-F3 e P1 e P2) foram tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de RNase (Sigma, St. Louis, MO, EUA), e marcadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio (IP). As amostras foram analisadas 15 minutos após a marcação. A fluorescência relativa dos núcleos marcados com IP foi

medida num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, EUA), equipado com um laser de argon operando a 488 nm.

Os fotões dispersos frontalmente são recebidos e analisados por um fotodíodo (detector da dispersão frontal). Os que se dispersam ortogonalmente (90°) são recebidos por uma série de filtros ópticos e analisados em tubos fotomultiplicadores (dispersão lateral e fluorescência). O integral de fluorescência juntamente com a altura e a largura do pulso de fluorescência emitida dos núcleos foram obtidos através de um filtro dicróico de passa-alto (645 nm) e de um filtro de passa-banda (620 nm), e seguidamente, convertidos em 1024 canais ADC. A linearidade do sistema foi testada usando um padrão de esferas fluorescentes (Coulter Electronics, Hialeah, FL). A voltagem foi ajustada de modo a que o pico haplóide se encontrasse posicionado no canal 200.

Os resultados foram obtidos na forma de três gráficos: um histograma com a intensidade de fluorescência do IP em escala linear, um citograma biparamétrico com o posicionamento dos núcleos consoante as suas características de dispersão frontal (FS) vs lateral da luz (SS). Foi ainda criado um outro citograma que relaciona a altura do pico de fluorescência emitida por cada núcleo com a área do pico. Este último gráfico permite a eliminação de dupletos, que apresentam a mesma altura de pico, mas uma área superior.

Com base no seu conteúdo em DNA, as células testiculares foram separadas em quatro categorias distintas: 1) sub-haplóides (espermatídeos alongados nos estádios X-XIV); 2) haplóides (espermatídeos redondos e em alongamento nos estádios I-IX); 3) diplóides (espermatogónias, espermatócitos secundários e células somáticas); 4) tetraplóides (espermatócitos primários e células em fase G2 do ciclo celular). A região entre os picos diplóide e tetraplóide é formada pelas células em fase de síntese activa de DNA (Fase S) (Spanò et al, 1996). Os resultados são apresentados em termos de proporção relativa de cada uma das categorias.

## 2.4.5 Avaliação da instabilidade dos microssatélites

### 2.4.5.1 Extração e purificação do DNA genómico

Foram recolhidos fragmentos de 25 mg de testículo que foram mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à extracção do DNA. Para extracção e purificação do DNA genómico foi usado o "DNeasy® Tissue Kit" (QIAGEN, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos de tecido congelados foram macerados em azoto líquido. Seguidamente, adicionaram-se 180  $\mu\text{L}$  de tampão de lise ATL e 20  $\mu\text{L}$  de proteinase K. Após forte agitação, as amostras foram incubadas a  $56^{\circ}\text{C}$  durante cerca de 24 horas até lise completa do tecido. De modo a eliminar o RNA, adicionaram-se 4  $\mu\text{L}$  de RNase A (QIAGEN, Alemanha) e após 2 minutos de incubação as amostras foram bem agitadas em vórtex durante 15 segundos. Em seguida, adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de tampão AL e 200  $\mu\text{L}$  de etanol (96-100%) a cada amostra, seguido de nova agitação em vórtex. O lisado foi colocado em colunas de separação "DNeasy Mini Spin" (membranas de sílica-gel) que se acoplaram a tubos colectores de 2 mL. Após centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto, para remoção dos contaminantes e inibidores enzimáticos (eg proteínas e catiões divalentes), descartou-se o tubo colector juntamente com o filtrado. De seguida, procedeu-se à lavagem do DNA para remoção dos contaminantes restantes. Para tal, cada coluna foi novamente acoplada a um novo tubo colector e a cada uma adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão AW1. Seguiu-se nova centrifugação com rejeição do tubo colector.

Cada coluna foi novamente acoplada a um novo tubo colector. Em seguida, adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão AW2, procedeu-se a uma nova centrifugação a 14000 rpm durante 3 minutos, até à secagem da membrana da coluna. As colunas foram novamente acopladas a um novo tubo colector e a cada membrana adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de tampão AE. Após 1 minuto de incubação à temperatura ambiente, efectuou-se uma centrifugação durante 1 minuto a 8000 rpm para eluição.

Após a extracção, o DNA foi mantido a  $-30^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização posterior. A concentração e pureza do DNA genómico foram estimadas por



electroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio (Anexo 3), comparando com um marcador de peso molecular ( $\lambda$  HindIII, NEB - Ipswich, MA, EUA), e por espectrofotometria, a 260 e 280 nm (1  $A_{260}$  unidade de dsDNA = 50  $\mu$ g/mL  $H_2O$ ; DNA puro:  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ ).

#### 2.4.5.2 *Análise da instabilidade dos microssatélites*

Para a detecção das mutações dos microssatélites foi utilizado um painel de seis marcadores moleculares desenvolvido por Kabbarah e colaboradores (2003) (Tabela 6).

Estes marcadores mostraram ser mais sensíveis do que os vulgarmente utilizados na detecção de IMS em tumores de ratinho. Os “primers” utilizados foram sintetizados pela MWG-Biotech (Alemanha), e os “forward primers” foram marcados com 6-FAM ou HEX (ABI, EUA).

Nas reacções de PCR foi utilizado um volume total de 10  $\mu$ L contendo: 1-20 ng de DNA genómico, tampão de reacção composto por  $MgCl_2$  a 1,5 mM (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), 0,8  $\mu$ M de cada “primer” e 0,4 UI de Taq DNA polimerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A amplificação do DNA foi realizada num termociclador PX2 (Thermo Hybaid, Alemanha). Fez-se um “touchdown” PCR com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 3 segmentos: desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento a 57-63°C durante 1 minuto e amplificação a 72°C durante 1 minuto. Finalmente fez-se uma amplificação a 72°C durante 5 minutos, sendo os produtos de PCR mantidos posteriormente a 4°C (Kabbarah et al, 2003).

As reacções de análise dos fragmentos foram preparadas misturando 1  $\mu$ L de cada produto de PCR com 0,5  $\mu$ L de padrão interno GeneScan, marcado com ROX® (Applied Biosystems, EUA) e 25  $\mu$ L de formamida desionizada. Os produtos de PCR foram visualizados por electroforese capilar utilizando um ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA). O tamanho dos fragmentos foi automaticamente calculado usando a opção Local Southern Method do programa GeneScan v.3.1.

**Tabela 6** Características dos microssatélites: locus, motivo repetido e sequências dos “primers”. Adaptado de Kabbarah et al (2003). F-“forward”; R-“reverse”.

<b>Marcador</b>	<b>Locus</b>	<b>Motivo repetido</b>	<b>Sequências dos “primers” (5' → 3')</b>
<b>Mus 1</b>	10B5.1	TG27	F: GGATCACTCGATGTACGGCTACTC R: CCAGGCAGGCAAAGCATTAT
<b>Mus 2</b>	15B1	TA27	F: CACCCCTTGCTACCACTAAGAAA R: CTCATTGGAGTTTGACCCATCA
<b>Mus 3</b>	5G1	GA29	F: CAGGAGGTCAAGGTCATCCTAAG R: CCACCATGGTAGGAGCTTGCTA
<b>Mus 4</b>	3A3	CT25CA27	F:GGAGATTCTGCTGTTCAAACAAG R:TCCTATACATGGGTGGAGTAGGA
<b>Mus 5</b>	17E4	A33	F:TACAGAGGATTGTCCTCTTGGAG R: GCTGCTTCACTGGACATTGGCT
<b>Mus 6</b>	17E4	A27	F: TCCCTGTATAACCCTGGCTGACT R: GCAACCAGTTGTCCTGGCGTGGA

## 2.5 Análise dos espermatozóides de ratinhos expostos a cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio

Neste trabalho foram analisados vários parâmetros dos espermatozóides dos ratinhos expostos aos compostos de cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio, nomeadamente a densidade no epidídimo, a morfologia, a integridade no acrossoma, a motilidade, a viabilidade, a função mitocondrial, a integridade do DNA pelo ensaio de TUNEL e susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida (SCSA).

### 2.5.1 Densidade

O epidídimo direito foi removido para uma caixa de Petri contendo meio de Tyrode modificado (MT6) (125 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,36 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5,56 mM glucose, 25 mM  $\text{NaHCO}_4$ , 1,80 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100 unidades de penicilina e 4 mg/mL BSA) preparado de acordo com Fraser (1984). A cauda do epidídimo foi dissecada com tesoura cirúrgica, tal com representado na Figura 12 e colocada em meio MT6 durante 30 minutos a 36°C, de modo a permitir a libertação dos espermatozóides para o meio. A concentração espermática foi determinada por contagem do número de células no hemocitómetro ("Neubauer Improved Chamber") ao microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus, Tóquio, Japão) (Kvist e Björndahl, 2002). Foi contado o número de células em pelo menos dois quadrados grandes dos cantos do hemocitómetro (1mm<sup>2</sup>), ignorando as células no limite superior e lateral direito de cada quadrado.

O número de espermatozóides/mL foi estimado multiplicando o valor médio por 10<sup>4</sup>.

### 2.5.2 Morfologia

A morfologia dos espermatozóides foi avaliada de acordo com Kvist e Björndahl (2002) com pequenas alterações. Fez-se um esfregaço em lâmina de vidro com uma pequena alíquota de suspensão de espermatozóides. Após secagem ao ar, as lâminas com os esfregaços foram fixadas em etanol a 95%, coradas com hematoxilina e eosina e posteriormente observadas ao microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus, Tóquio, Japão). Foram consideradas as anomalias na cabeça, peça intermediária e cauda em pelo menos 200 células, de acordo com os critérios definidos por Wyrobek e Bruce (1975).

### 2.5.3 Integridade do acrossoma

A integridade do acrossoma dos espermatozóides foi determinada de acordo com Lu e Shur (1997). Para tal, fixaram-se os espermatozóides em PBS

com 5% de formaldeído, durante 30 min a 23°C. Os espermatozóides fixados foram colhidos por centrifugação a 1000 g durante 5 minutos e seguidamente ressuspensos em acetato de amónia 0,1M a pH 9,0. Os espermatozóides foram lavados e novamente ressuspensos em acetato de amónia. Uma alíquota de 20 µL desta suspensão foi colocada numa lâmina de vidro, seca ao ar e posteriormente corada com Coomassie Blue G250 a 0,22%, numa solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético glacial, durante 2 minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água corrente, secas ao ar e montadas em Eukitt®. A integridade do acrossoma foi avaliada ao microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus, Tóquio, Japão) com ampliação de 1000x. Consideraram-se espermatozóides com acrossoma íntegro, aqueles que apresentavam a região anterior da cabeça intensamente marcada (Larson e Miller, 1990; Lu e Shur, 1997).

#### **2.5.4 Motilidade**

Para análise da motilidade foram colhidas alíquotas de 20 µL de espermatozóides em meio MT6 para lâminas pré-aquecidas. Este parâmetro foi avaliado por contagem de todos os espermatozóides móveis progressivos e não progressivos e imóveis, num campo do microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus, Tóquio, Japão). Em cada preparação foram contabilizados pelo menos 100 espermatozóides. Este procedimento foi repetido numa nova preparação da mesma amostra de espermatozóides.

#### **2.5.5 Viabilidade**

Os epidídimos foram dissecados em tampão HEPES salino contendo albumina de soro bovino (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% BSA, pH 7,4). Uma alíquota de 200 µL de suspensão de espermatozóides foi diluída em 1,8 mL de tampão HEPES salino, à qual se adicionaram 2 µL de solução de SYBR-14 diluído em DMSO, segundo instruções do fabricante. A mistura foi incubada durante 8 minutos a 36°C. Seguidamente, adicionaram-se 5 µL de iodeto de propídio, de modo a perfazer uma concentração final de 12,5 µM. A mistura foi novamente incubada durante 8 min a 36°C. As amostras foram

imediatamente analisadas em citómetro de fluxo Coulter EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, EUA) equipado com um laser de argon operando a 488 nm. A fluorescência verde do SYBR-14 foi detectada no sensor FL1 com um filtro dicróico passa-alto a 550 nm e um filtro passa-banda (525 nm), enquanto que a fluorescência vermelha do IP foi detectada pelo sensor FL3 com um filtro dicróico passa-alto (645 nm) e um filtro passa-banda (620 nm). Os espermatozóides foram seleccionados com base nas suas propriedades de dispersão frontal (FS) e ortogonal (SS) da luz. Foram analisadas pelo menos 10000 células em cada amostra, a uma taxa de 200 células/s. As células vivas apresentam marcação IP- e SYBR-14+, enquanto que as células mortas são IP+ e SYBR-14-. As células que apresentaram padrão de marcação positivo quer para o SYBR-14, quer para o IP foram incluídas na população de células vivas. A percentagem de células vivas foi calculada com base na razão SYBR-14+/número total de espermatozóides seleccionado nos citogramas FS vs SS.

### **2.5.6 Função mitocondrial**

A rodamina 123 (Rh123) é um fluorocromo catiónico que se acumula nas mitocôndrias. Possui um máximo de absorção a 488 nm e emite a 515-575 nm (fluorescência verde). A avaliação da função mitocondrial dos espermatozóides foi feita segundo os protocolos descritos por Papaioannou e colaboradores (1997). Uma solução inicial de Rh123 numa concentração de 1 mg/mL em metanol (-20°C) foi diluída em água para uma concentração de 0,1 mg/mL. A uma alíquota de 400 µL de suspensão de espermatozóides adicionaram-se 10 µL de solução de rodamina diluída. As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 36°C e posteriormente centrifugadas a 500 g durante 5 minutos. Seguidamente, as amostras foram ressuspensas em novo meio MT6 ao qual se adicionou IP numa concentração de 0,1 mg/mL, 5 minutos antes da análise por citometria de fluxo de acordo com as condições descritas na secção anterior, sendo as células marcadas positivamente com Rh123 detectadas no sensor FL1. As células com mitocôndrias funcionalmente activas consideram-se Rh123+, enquanto que as células sem mitocôndrias funcionalmente activas se consideram Rh123-. A percentagem de células com

mitocôndrias funcionalmente activas foi calculada com a razão Rh123+/ número total de espermatozóides seleccionado nos citogramas FS vs SS.

### **2.5.7 Análise de quebras na cadeia de DNA por TUNEL**

A presença de quebras na cadeia de DNA dos espermatozóides foi avaliada utilizando o "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling" (TUNEL), usando o "In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), com pequenas alterações ao protocolo do fabricante. As amostras foram descongeladas em gelo e, seguidamente, sujeitas a uma centrifugação (500 g, durante 6 minutos) e dupla lavagem em tampão fosfato salino (PBS) com 1% albumina de soro bovino (BSA) a pH 7,4. As amostras foram fixadas com a adição de 100 µL de paraformaldeído a 1% (Anexo 3) a 100 µL de suspensão de espermatozóides. As amostras foram mantidas em fixador durante 1 hora em agitação, à temperatura ambiente. Seguidamente, as células foram lavadas em PBS com 1% BSA de modo a remover o fixador e em seguida foram permeabilizadas com 100 µL de Triton X-100 a 0,1% em citrato de sódio a 0,1% durante 2 minutos em gelo (4°C). Após a lavagem das células em PBS com BSA a 1%, o sobrenadante foi removido e procedeu-se em seguida à marcação fluorescente com 50 µL de "labelling solution" (fornecida pelo "In Situ Cell Death Detection Kit") contendo "terminal deoxynucleotidyl transferase" (TdT) durante 1 hora, a 37°C, na obscuridade. Após a marcação fluorescente, efectuaram-se duas lavagens em PBS com BSA a 1% e em seguida procedeu-se à ressuspensão das células no mesmo tampão, ao qual se adicionou IP numa concentração final de 0,5 µg/mL. Como controlos deste ensaio constituíram-se os seguintes grupos: um controlo positivo, no qual os espermatozóides fixados e permeabilizados foram incubados com 5 UI de DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) durante 45 min, a 37°C, antes da adição da mistura de reacção ("labelling solution" e TdT), de modo a induzir fragmentação do DNA; e um controlo negativo, no qual os espermatozóides fixados e permeabilizados foram preparados como descrito anteriormente, embora na ausência da enzima TdT. As amostras foram

analisadas por citometria de fluxo em condições idênticas às referidas na secção 2.5.5, sendo as células com marcação positiva para TUNEL (fluoresceína) detectadas no sensor FL1. Foram analisadas pelo menos 10000 células em cada amostra, a um fluxo inferior a 200 células/s, após selecção de lixo ("debris") no citograma SS vs SS.

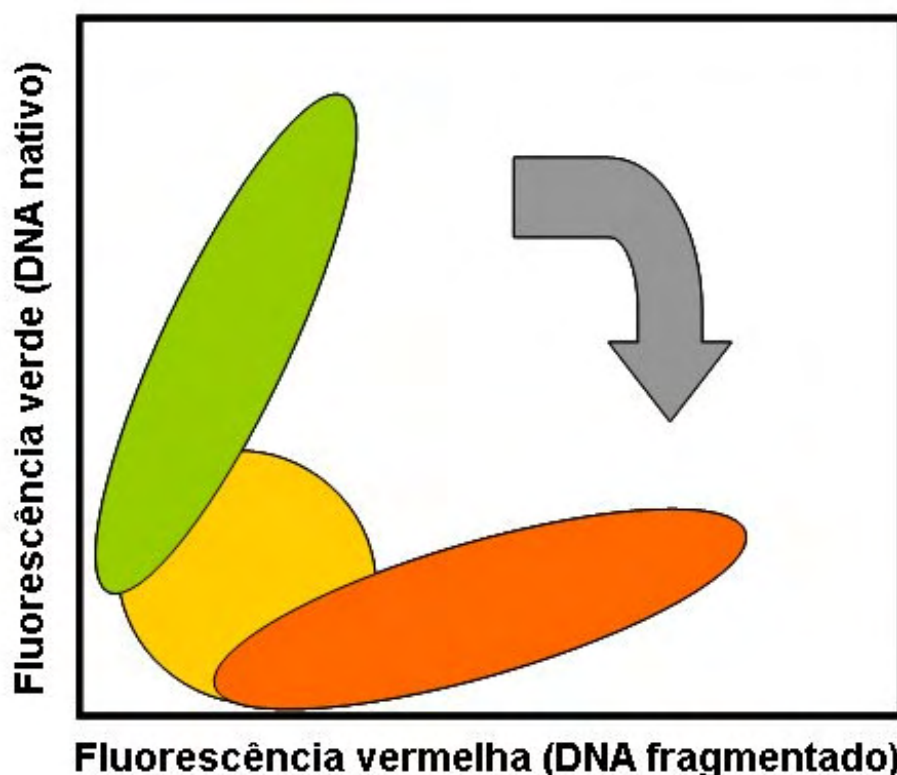
### 2.5.8 Anomalias da estrutura da cromatina por SCSA

O SCSA permite quantificar o índice de espermatozóides com estrutura da cromatina anormal. Este valor é fornecido pela susceptibilidade do DNA dos espermatozóides à desnaturação ácida, induzida *in situ* (Evenson e Jost, 2000). Este ensaio é baseado nas propriedades da laranja de acridina (LA) que emite fluorescência verde (515-530 nm) quando se encontra intercalada na cadeia dupla de DNA nativo e fluorescência vermelha (630-640 nm) quando se encontra intercalada na cadeia simples de DNA desnaturado. O SCSA quantifica a transição de fluorescência de verde (DNA nativo em cadeia dupla) para vermelho (DNA desnaturado) da laranja de acridina (Figura 13).

O SCSA foi efectuado de acordo com o protocolo descrito por Traina e colaboradores (2005). Sucintamente, o epidídimo esquerdo foi removido e dissecado numa caixa de Petri contendo 2 mL de tampão TNE (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) a 4°C.

As amostras foram posteriormente transferidas para tubos cónicos de polietileno, de forma a permitir a sedimentação dos fragmentos de maiores dimensões e em seguida filtradas através de um filtro de malha de nylon para microtubos contendo glicerol numa concentração final de 10% (v/v) e mantidas em arca congeladora a -80°C até análise por citometria de fluxo.

As amostras foram posteriormente descongeladas, sendo mantidas em gelo até descongelarem completamente e, seguidamente, foram diluídas em tampão TNE até à obtenção de uma concentração de  $1-2 \times 10^6$  células/mL. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de solução detergente ácida (0,08 M HCl, 0,15 M NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 1,2) a 100 µL de amostra. Passados 30 segundos, adicionaram-se 600 µL de solução de laranja de acridina (LA), numa



**Figura 13** Representação esquemática de um citograma biparamétrico do SCSA. A verde está representada a população de células com DNA nativo (cadeia dupla) e a laranja e vermelho as populações com DNA desnaturado (cadeia simples). Adaptado de Evenson e Jost (2000).

concentração de 6 µg/ mL em tampão corante (0,15 M NaCl, 0,1 M ácido cítrico monohidratado, 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 6,0). Por uma questão de uniformização, todas as amostras foram lidas no citômetro de fluxo, exactamente 3 minutos após a marcação fluorescente com a solução de laranja de acridina. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo em condições idênticas às referidas na secção 2.5.5, sendo as células com fluorescência verde detectadas no sensor FL1 e as células com fluorescência vermelha detectadas no sensor FL3. Em cada amostra analisaram-se pelo menos 10000 células a um fluxo inferior a 200 células/s.

Os dados foram exportados para ficheiros do tipo LMD (Listmode File Format) e analisados em modo “offline” com o programa FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregon, EUA), tal como descrito por Banks e colaboradores



(2005). A extensão da desnaturação do DNA foi quantificada com base no cálculo do parâmetro DFI ("DNA Fragmentation Index"). Este baseia-se no cálculo da razão fluorescência vermelha/ fluorescência total, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{DFI} = \frac{\text{Fluorescência vermelha}}{\text{Fluorescência vermelha} + \text{Fluorescência verde}}$$

Com base no DFI, foi possível estabelecer três subpopulações distintas, traduzidas em percentagem: espermatozóides sem fragmentação do DNA, espermatozóides com moderada fragmentação do DNA e espermatozóides com elevada fragmentação do DNA. A %DFI indica a percentagem de células com um moderado ou elevado rácio entre fluorescência vermelha e fluorescência total e constitui um indicador da estrutura anormal da cromatina. Outro parâmetro importante refere-se à percentagem de células com elevada fluorescência verde ("High DNA Stainability" - %HDS), que corresponde à percentagem de espermatozóides imaturos com incompleta condensação da cromatina.

### **2.5.9 Microscopia de fluorescência**

Paralelamente à análise por citometria de fluxo, as amostras marcadas para análise da sua viabilidade, função mitocondrial e ensaio de TUNEL, foram também analisadas ao microscópio de fluorescência, utilizando para tal um microscópio Olympus BX 41 (Olympus, Tóquio, Japão) com lâmpada de mercúrio. A fluorescência verde (SYBR-14, Rh123 e fluoresceína) foi detectada com um filtro de U-MWIBA2 (excitação a 460-490 nm emissão a 510-550 nm e espelho dicromático a 505 nm). A fluorescência do IP foi detectada com um filtro U-MWIG2 (excitação a 520-550 nm, emissão a 580 nm e espelho dicromático a 565 nm). As imagens foram adquiridas com câmara digital Camedia C-5060 Wide Zoom (Olympus, Tóquio, Japão).

## 2.6 Tratamento estatístico

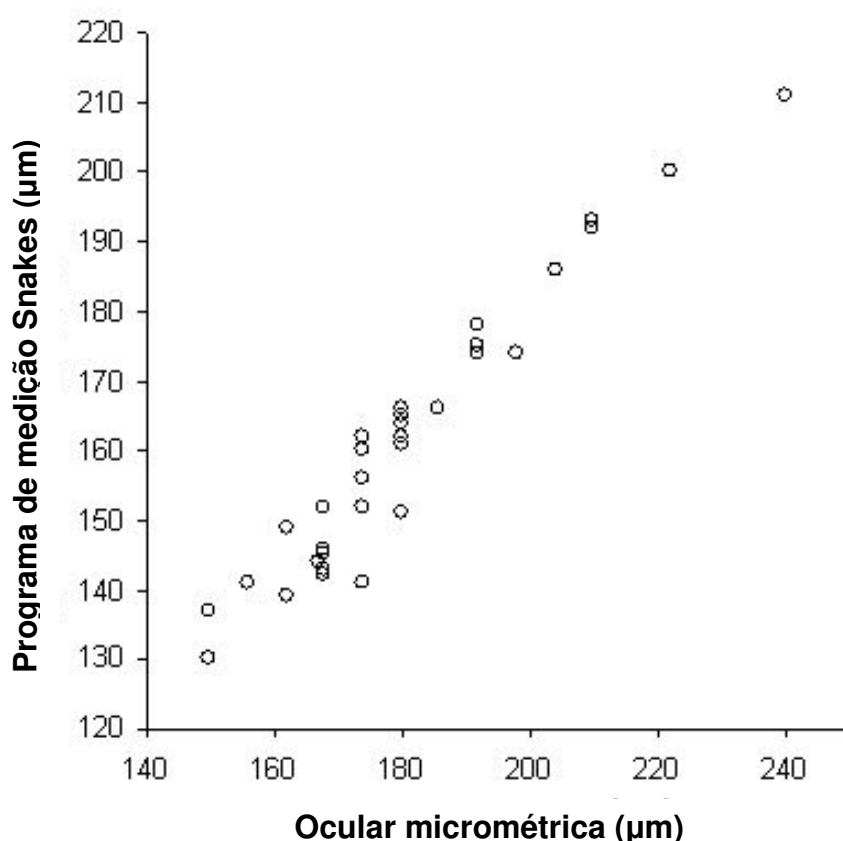
Os resultados são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise estatística foi utilizado o programa SigmaStat para Windows (Version 3.1, SPSS Inc., EUA). As comparações estatísticas entre os grupos controlo e os expostos aos diversos compostos de metais foram efectuadas utilizando uma análise de variância (ANOVA) a uma dimensão, seguida pelo teste de Tuckey ou de Student-Newman-Keuls. Para avaliar as correlações entre os diferentes parâmetros analisados foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) (Zar, 1996). O nível de significância estatística foi estabelecido a  $p < 0,05$ .

### **3. RESULTADOS**

### 3.1 Estudo morfométrico dos tubos seminíferos

Nesta secção são apresentados os resultados da optimização do programa morfométrico de medição do diâmetro dos tubos seminíferos. É ainda apresentada a aplicação deste programa de medição do diâmetro dos tubos seminíferos aos estudos de toxicidade do cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio.

Com o objectivo de verificar a calibração da ferramenta de medição do diâmetro dos tubos seminíferos, correlacionaram-se os valores do diâmetro obtidos através da medição com ocular micrométrica, com os obtidos através da ferramenta para os mesmos tubos. Obteve-se uma correlação positiva ( $r=0,97$ ,  $p<0,0001$ ), tal como se pode observar na Figura 14.



**Figura 14** Correlação de Pearson entre as medições obtidas com a ferramenta e as medições obtidas com a ocular micrométrica.

### 3.2 Selecção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo

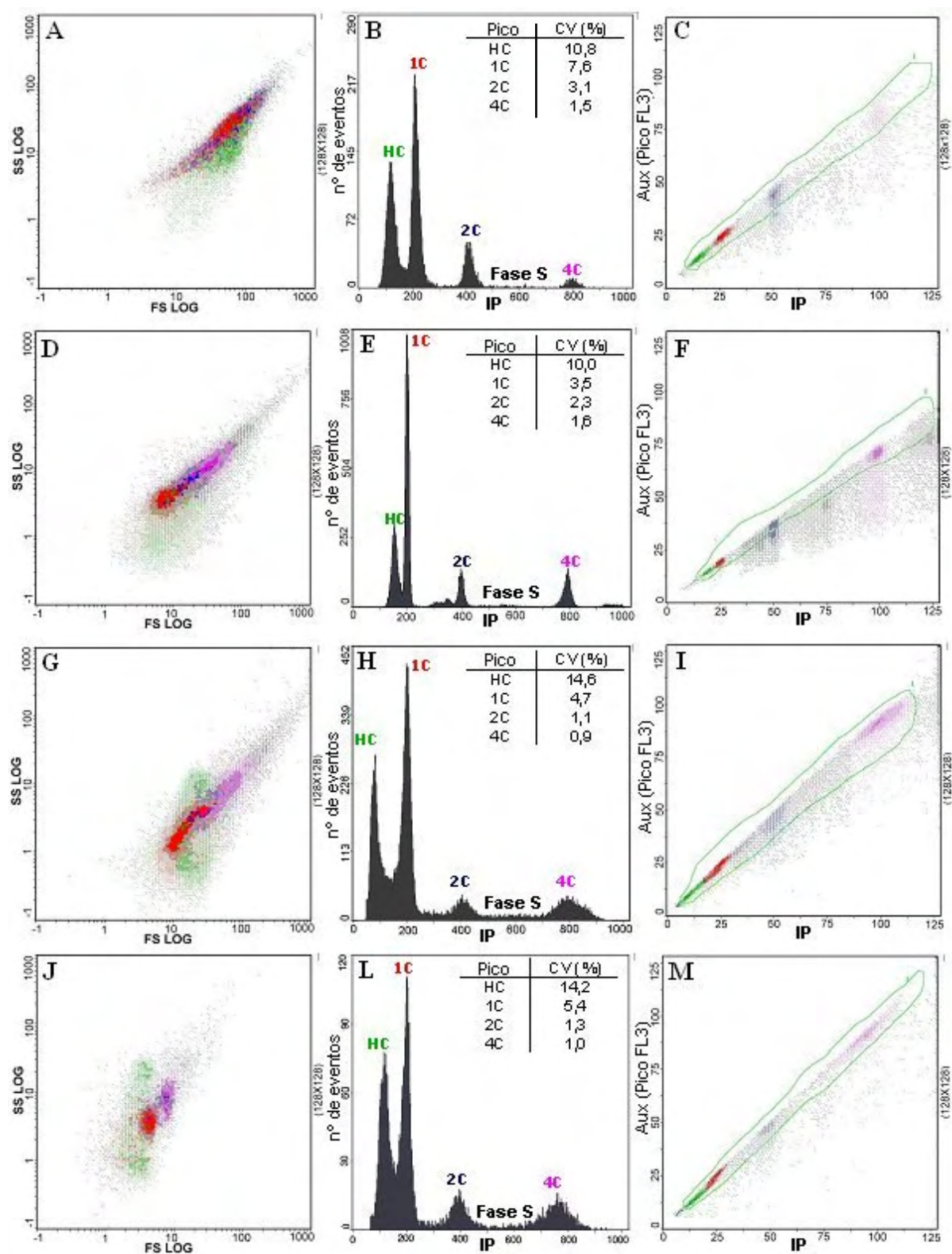
A dispersão frontal da luz (FS) é proporcional à área ou dimensão das células, enquanto que a dispersão ortogonal da luz (SS) é proporcional à granulosidade ou complexidade interna das células. Com os diferentes métodos testados para o isolamento dos núcleos obtiveram-se diferentes resultados em termos de propriedades de dispersão da luz por parte dos núcleos. Os núcleos isolados de amostras a fresco (Protocolos F2 e F3) apresentaram uma distribuição homogénea numa única população (Figura 15A e D). Contrariamente, os núcleos obtidos a partir de material parafinado apresentaram populações discretas em termos de dimensão relativa e complexidade (Figuras 15G e J). A melhor separação dos núcleos em termos de dispersão da luz foi observada nos núcleos isolados pelo Protocolo P2 (Figura 15J).

A intensidade de fluorescência linear representa a fluorescência do DNA corado com o iodeto de propídio (Figuras 15B, E, H e L). Com o protocolo F1 não se obteve boa definição dos picos e, por essa razão, os respectivos resultados não são aqui apresentados. Os histogramas de DNA obtidos com os restantes protocolos de material fresco e ambos os protocolos com material parafinado apresentam quatro picos principais, correspondendo a quatro níveis de ploidia diferentes. No pico sub-haplóide encontram-se os espermátídeos alongados, enquanto que o pico haplóide corresponde aos espermátídeos redondos. A discriminação das células haplóides em dois picos diferentes é devida a diferenças de coloração entre os espermátídeos alongados e redondos, uma vez que os primeiros apresentam uma maior condensação da cromatina diminuindo a acessibilidade do IP ao DNA. As células somáticas, as espermatogónias e os espermátídeos secundários encontram-se no pico diplóide. As células em fase G2 do ciclo celular e os espermátócitos primários estão incluídos no pico tetraplóide. A região entre o pico diplóide e o pico tetraplóide corresponde aos núcleos em fase de síntese de DNA (fase S).

O coeficiente de variação (CV) médio obtido para todos os protocolos está representado nas Figuras 15B, E, H e L. Os valores de CV mais elevados foram encontrados na população sub-haplóide. Este valor de CV mais elevado pode ser explicado por diferentes níveis de intercalação do IP com o as bases do DNA, devido a diferentes graus de condensação da cromatina apresentados pelos espermátídeos alongados.

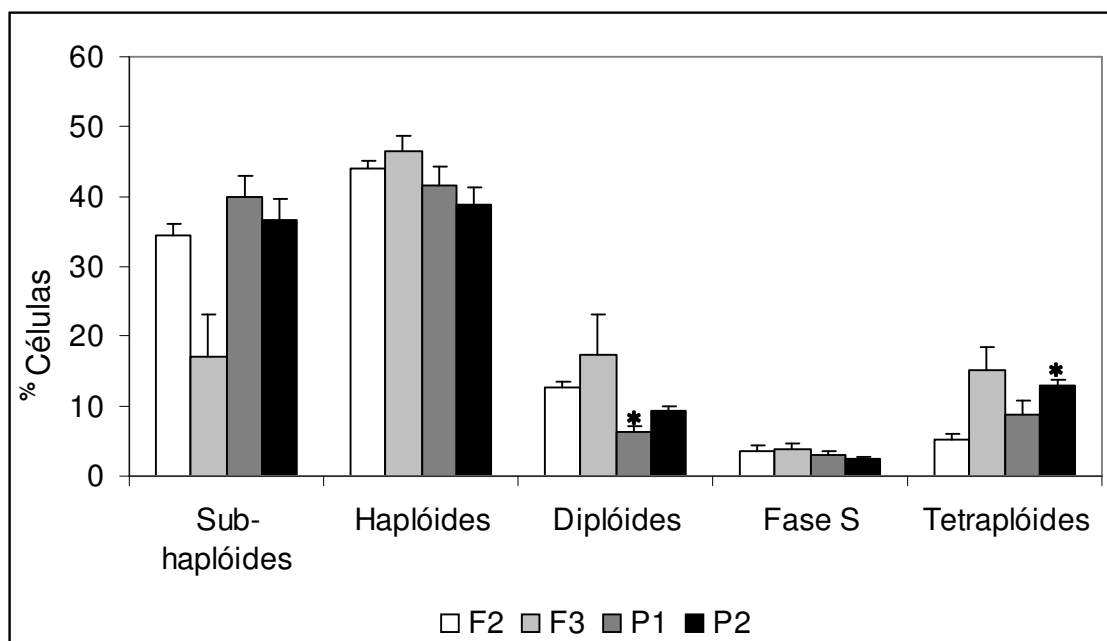
Os citogramas com o integral do pulso vs altura do pulso de fluorescência permitiram definir uma região de modo a excluir os dupletos. Os núcleos das amostras a fresco (Figuras 15C e F) apresentaram maior número de dupletos do que as amostras parafinadas (Figuras 15I e M), com o menor número de dupletos a ser observado com o protocolo P2. Os protocolos F2 e F3 mostraram resultados significativamente diferentes ( $p < 0,001$ ) no que respeita ao rácio das subpopulações. Ambos os protocolos F2 e F3 apresentaram picos discretos e valores de CV semelhantes. Contudo, foram encontradas algumas diferenças nas percentagens de cada subpopulação: com o protocolo F2 (Figuras 15B e 16) a população sub-haplóide representou 34% da população de células, enquanto que com o protocolo F3 (Figuras 15E e 16) esta subpopulação de células representou apenas 17% do total. Nas amostras parafinadas, as percentagens das subpopulações foram semelhantes às encontradas através do protocolo F2 (Figura 16). Os resultados obtidos com o protocolo F2 apresentaram uma correlação positiva com os obtidos quer com o protocolo P1 (correlação de Pearson  $r > 0,96$ ;  $p = 0,007$ ), quer com o protocolo P2 ( $r > 0,96$ ;  $p = 0,009$ ). Os resultados obtidos com os protocolos de material parafinado também se correlacionam entre si (correlação de Pearson  $r = 0,992$ ;  $p = 0,0008$ ).

**Figura 15** (página seguinte) Gráficos de citometria de fluxo das células isoladas a partir de tecido fresco pelos Protocolos F2 (A, B, C) e F3 (D, E, F) e tecido incluído em parafina pelos Protocolos P1 (G, H, I) e P2 (J, L, M). Os citogramas da coluna da esquerda mostram a dispersão frontal (FS) vs dispersão lateral (SS) da luz. Os histogramas da coluna ao centro mostram a intensidade de fluorescência relativa (FL) do IP. Os citogramas da coluna à direita mostram o integral do pulso de fluorescência relativa vs a altura do pulso de fluorescência relativa. HC: pico sub-haplóide; 1C: pico haplóide; 2C: pico diplóide; 4C: pico tetraplóide.





Para os ensaios toxicológicos de exposição a cloreto de chumbo, cloreto de cádmio e cromato de potássio foi seleccionado o protocolo P2.



**Figura 16** Variação das percentagens de ploidia das células germinativas isoladas pelos Protocolos F2 e F3 (tecido fresco), e Protocolos P1 e P2 (tecido parafinado). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa para mesmo parâmetro entre amostras de tecido fresco e de tecido parafinado  $p < 0,05$ .

### 3.3 Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade do ratinho

#### 3.3.1 Avaliação da taxa de sobrevivência

A administração de cloreto de chumbo nas doses testadas não induziu mortalidade nos animais.

#### 3.3.2 Avaliação dos pesos

A administração de cloreto de chumbo, nas doses de 74 e 100 mg/kg pc não induziu alterações significativas no peso dos ratinhos, bem como nos

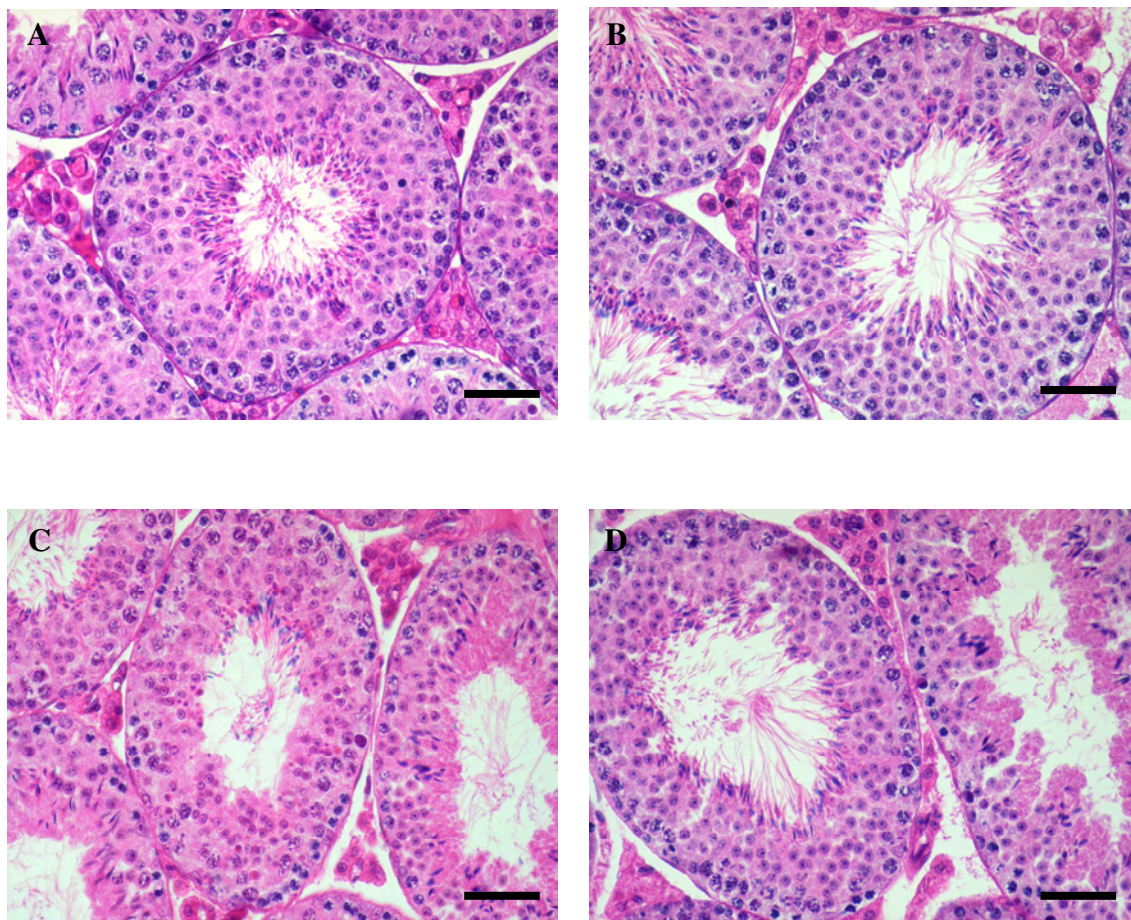
pesos absolutos ou relativos dos testículos e epidídimos, quer 5 dias após o início da administração, quer após 35 dias (Tabela 7).

**Tabela 7** Efeito do cloreto de chumbo no peso corporal, testicular e epididimal dos ratinhos e razão peso testicular/corporal e peso epididimal/corporal. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

	mgPbCl <sub>2</sub> / kg pc	Peso corpo (g)	Peso testículo (g)	Peso do epidídimo (g)	Peso testículo/ corpo (%)	Peso epidídimo/ corpo (%)
<b>5d</b>	<b>0 (Controlo)</b>	36,3 $\pm$ 0,8	0,123 $\pm$ 0,005	0,047 $\pm$ 0,001	0,340 $\pm$ 0,010	0,130 $\pm$ 0,002
	<b>74</b>	36,4 $\pm$ 0,6	0,124 $\pm$ 0,004	0,049 $\pm$ 0,001	0,341 $\pm$ 0,012	0,135 $\pm$ 0,004
	<b>100</b>	36,8 $\pm$ 0,9	0,128 $\pm$ 0,006	0,048 $\pm$ 0,002	0,353 $\pm$ 0,023	0,130 $\pm$ 0,005
<b>35d</b>	<b>0 (Controlo)</b>	38,5 $\pm$ 1,2	0,138 $\pm$ 0,007	0,058 $\pm$ 0,003	0,359 $\pm$ 0,017	0,143 $\pm$ 0,008
	<b>74</b>	38,7 $\pm$ 1,0	0,127 $\pm$ 0,004	0,056 $\pm$ 0,000	0,330 $\pm$ 0,012	0,147 $\pm$ 0,005
	<b>100</b>	38,5 $\pm$ 4,9	0,129 $\pm$ 0,009	0,053 $\pm$ 0,003	0,338 $\pm$ 0,025	0,155 $\pm$ 0,011

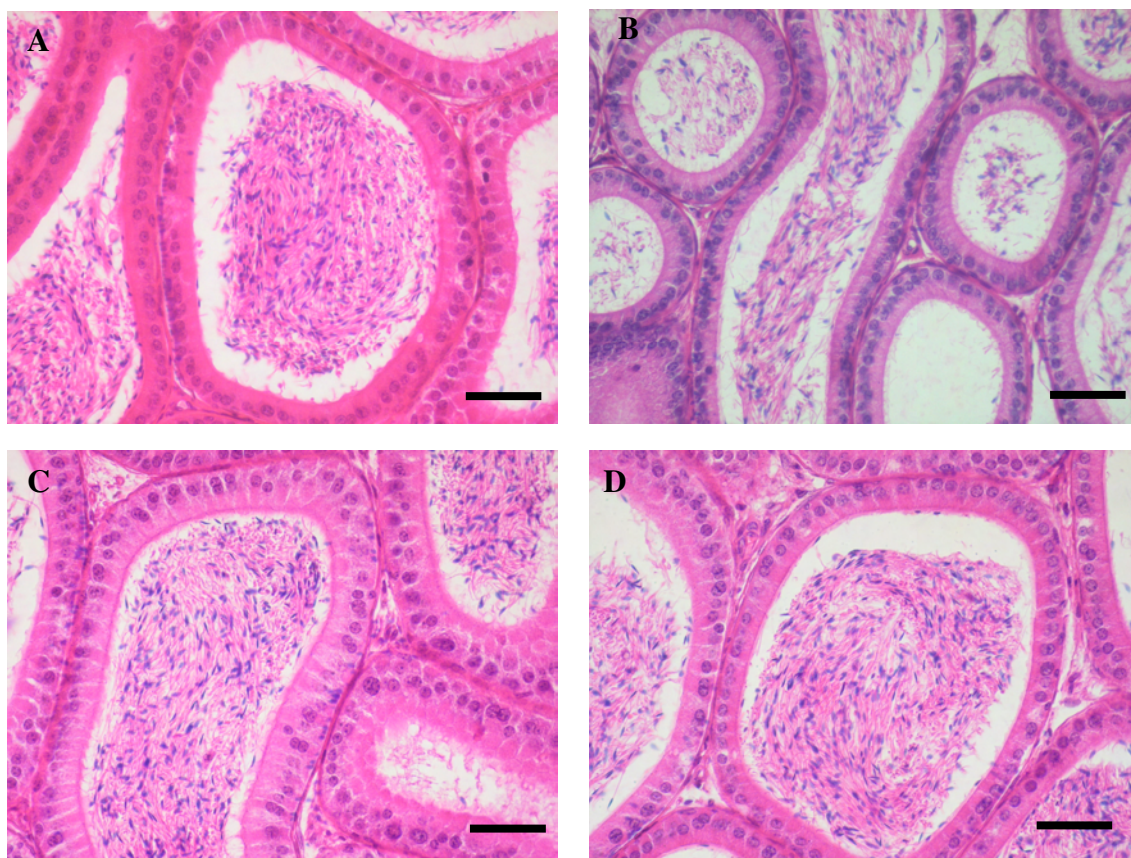
### 3.3.3 Análise histológica do testículo e epidídimo

A administração de 74 e 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc não afectou significativamente a histologia do testículo quer 5 dias após o início da exposição, quer após 35 dias (Figura 17).



**Figura 17** Efeito do cloreto de chumbo na histologia do testículo ao fim de 5 dias (A) controle, (B) 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc e ao fim de 35 dias (C) controle, (D) 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. A barra representa 40 μm.

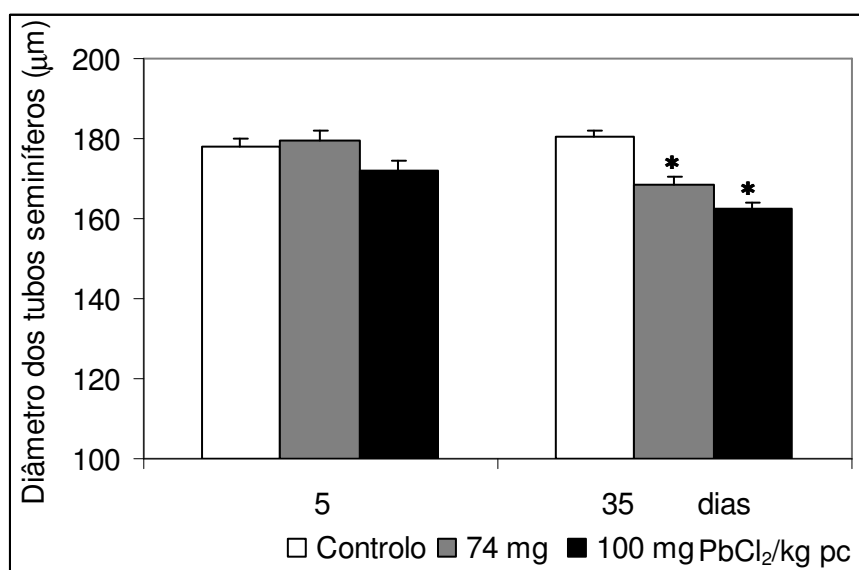
Não foram observadas alterações significativas na histologia do epidídimo após a exposição a cloreto de chumbo, para nenhuma das doses testadas e em nenhum dos períodos de análise (Figura 18).



**Figura 18** Efeito do cloreto de chumbo na histologia do epidídimo ao fim de 5 dias (A) controle, (B) 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc e ao fim de 35 dias (C) controle, (D) 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. A barra representa 40 μm.

### 3.3.3.1 Estudo morfométrico dos tubos seminíferos

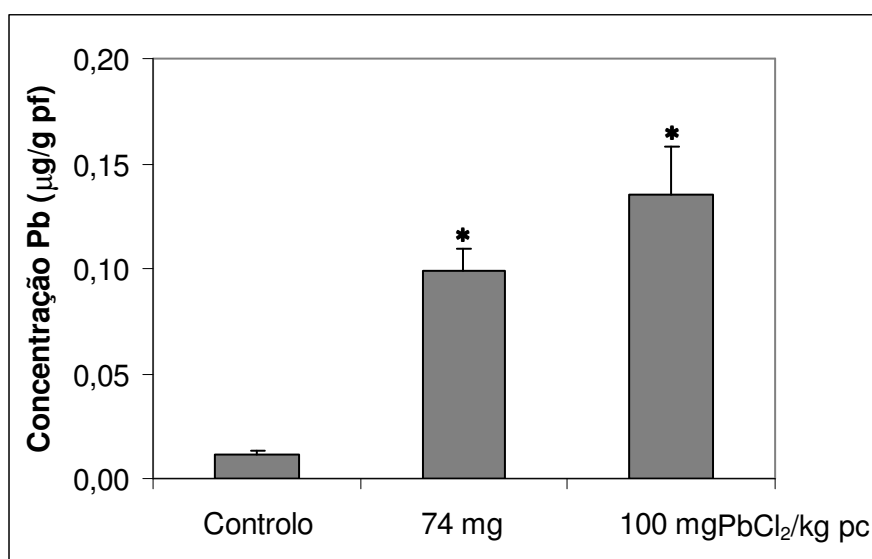
Cinco dias após início da exposição ao cloreto de chumbo, não se observaram alterações significativas do diâmetro dos tubos seminíferos, contrariamente ao período dos 35 dias, no qual se verificou uma redução significativa do diâmetro dos tubos seminíferos para as duas doses administradas (74 e 100 mg de PbCl<sub>2</sub>/kg pc) (Figura 19).



**Figura 19** Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos administrados com 74 e 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e sacrificados após 5 dias ou 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo  $p < 0,001$ .

### 3.3.4 Quantificação dos níveis de chumbo no testículo

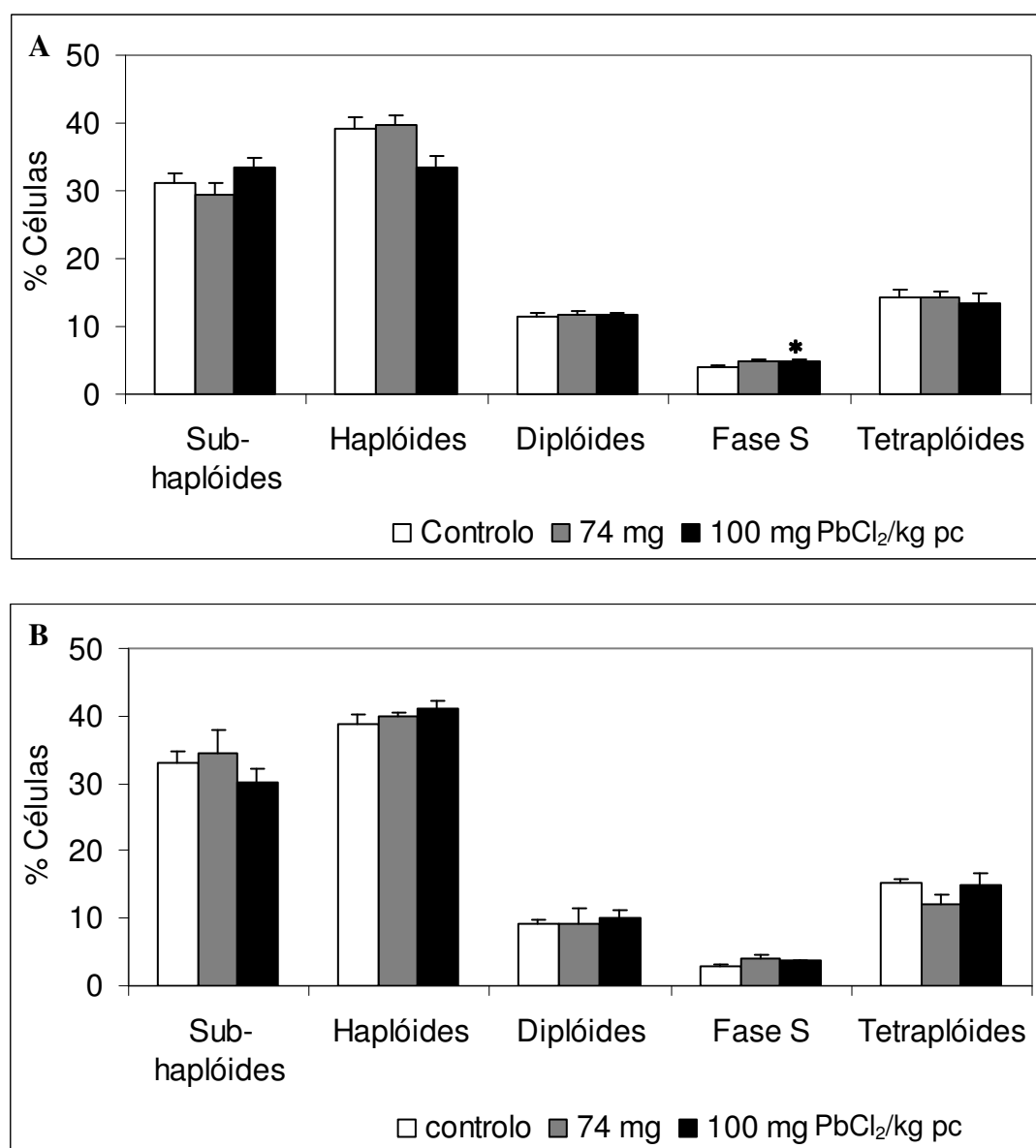
Os níveis de chumbo nos testículos aumentaram significativamente com a exposição a cloreto de chumbo ( $p < 0,001$ ), sendo maior a acumulação nos tecidos em função da dose administrada ( $y = 0,062x - 0,0419$ ;  $r^2 = 0,9491$ ) (Figura 20). Para a dose de 74 mg de  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  a concentração de chumbo no testículo aumentou 8,4 vezes em relação ao controlo, enquanto que para a dose de 100 mg de  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  o aumento foi de 11,5 vezes.



**Figura 20** Concentração dos níveis de chumbo nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com 74 e 100 mg PbCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 5 dias após o início da exposição. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo  $p < 0,001$ .

### 3.3.5 Análise do conteúdo em DNA nuclear das células do testículo

A administração de cloreto de chumbo durante quatro dias consecutivos induziu algumas variações nas subpopulações de células germinativas. Contudo, apenas a percentagem de células com núcleos em fase S foi significativamente afectada ( $p < 0,05$ ) pela dose de chumbo mais elevada (Figura 21).



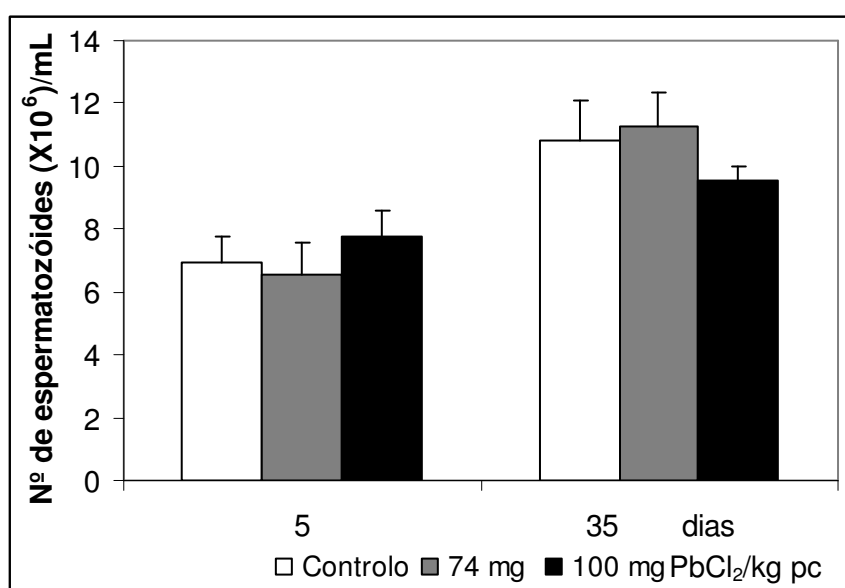
**Figura 21** Percentagens relativas das células germinativas isolados de testículos de ratinhos controlo e administrados com cloreto de chumbo ao fim de 5 dias (A) e ao fim de 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

### 3.3.6 Análise dos efeitos na função espermática

Com objectivo de avaliar o efeito do cloreto de chumbo na função espermática foi avaliado um vasto conjunto de parâmetros, nos ratinhos injectados com 74 e 100 mg de PbCl<sub>2</sub>/kg pc, tal como se referiu anteriormente.

### 3.3.6.1 Densidade

A densidade de espermatozóides nos ratinhos administrados com 74 e 100 mg de  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  foi avaliada 5 e 35 dias após o início da experiência. Não se verificaram alterações significativas na densidade de espermatozóides nos dois períodos de análise (Figura 22).

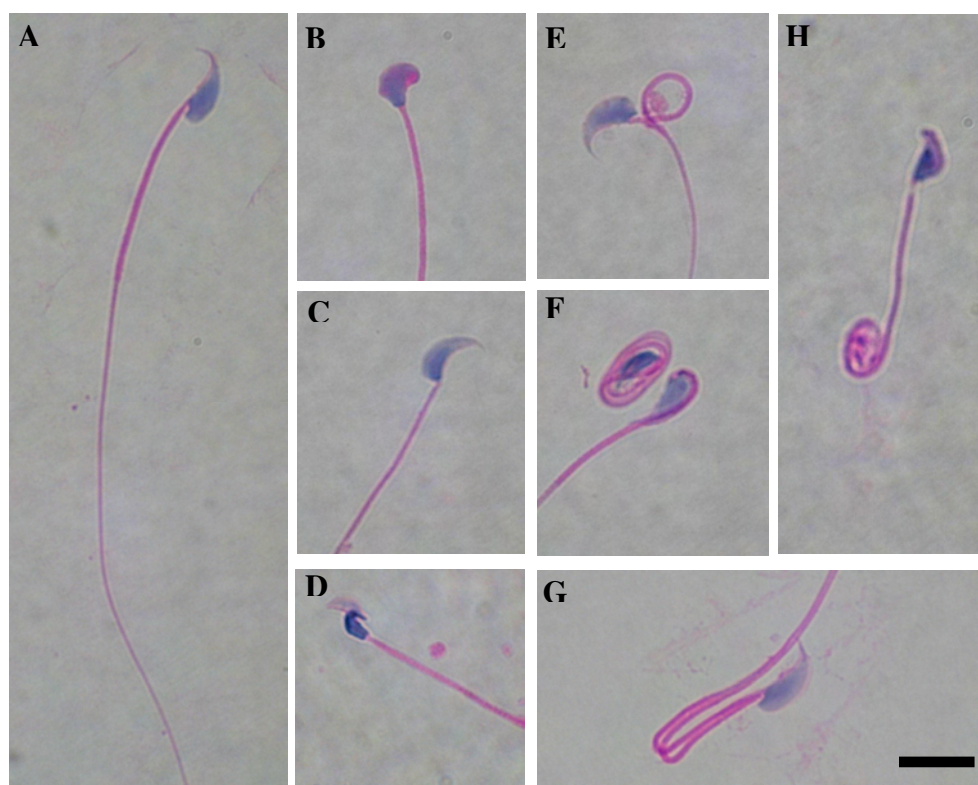


**Figura 22** Efeito do cloreto de chumbo na densidade de espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

### 3.3.6.2 Morfologia

A Figura 23 mostra os critérios utilizados para a classificação morfológica dos espermatozóides de ratinho. No que diz respeito à exposição ao cloreto de chumbo, observou-se uma redução da percentagem de espermatozóides com morfologia normal nos ratinhos expostos a 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$  e sacrificados no período de 5 dias (Tabela 8). No período de 35 dias observou-se uma tendência para a redução da percentagem de espermatozóides com morfologia normal nos ratinhos injectados com 100 mg  $\text{PbCl}_2/\text{kg pc}$ . Contudo, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).





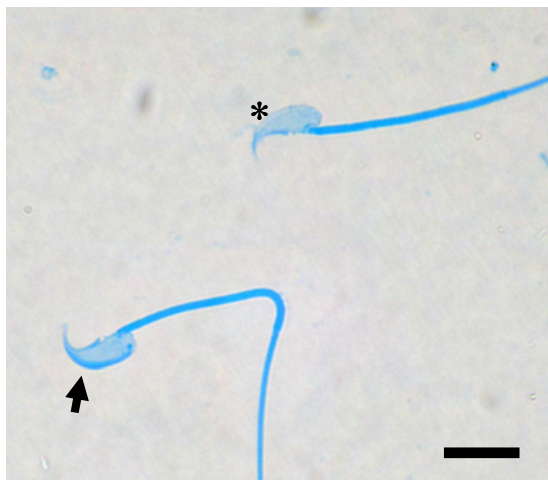
**Figura 23** Classificação morfológica dos espermatozoides de ratinho provenientes do epidídimo. A) Espermatozoides com morfologia normal, B-D) Anomalias na cabeça, E) Anomalias na peça intermediária, F, G) Anomalias na cauda, H) Anomalias múltiplas (cabeça e cauda). A barra representa 10  $\mu$ m para todas as imagens.

### 3.3.6.3 Integridade do acrossoma

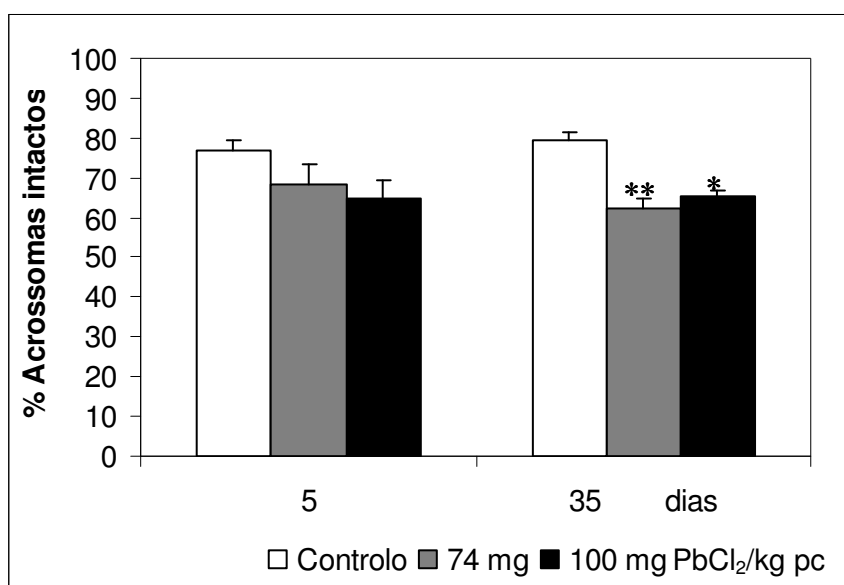
A análise da presença do acrossoma por coloração com Coomassie Blue (Figura 24) revelou uma tendência para a diminuição da percentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro, nos ratinhos administrados com cloreto de chumbo e sacrificados ao fim de 5 dias (Figura 25). Contudo, neste período, esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). No período dos 35 dias foi observado o mesmo efeito, embora neste caso as diferenças fossem estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8** Efeito do cloreto de chumbo na morfologia dos espermatozóides após 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

		Controlo	74 mg PbCl <sub>2</sub> /kg pc	100 mg PbCl <sub>2</sub> /kg pc
5 dias	Morfologia Normal (%)	75,9 $\pm$ 1,7	73,0 $\pm$ 1,4	68,4 $\pm$ 1,3 *
	Anomalias cabeça (%)	10,1 $\pm$ 1,2	10,3 $\pm$ 0,8	18,1 $\pm$ 3,5
	Anomalias cauda (%)	12,9 $\pm$ 2,4	15,1 $\pm$ 2,0	11,2 $\pm$ 1,9
	Anomalias peça intermediária (%)	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,2
	Anomalias múltiplas (%)	0,4 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1
35 dias	Morfologia Normal (%)	77,7 $\pm$ 0,7	69,8 $\pm$ 3,4	71,0 $\pm$ 3,52
	Anomalias cabeça (%)	11,7 $\pm$ 1,0	17,2 $\pm$ 2,5	17,6 $\pm$ 3,5
	Anomalias cauda (%)	9,8 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 2,1	9,2 $\pm$ 3,5
	Anomalias peça intermediária (%)	0,6 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 0,7
	Anomalias múltiplas (%)	0,2 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 0,3



**Figura 24** Espermatozóides de ratinho com acrossoma intacto, intensamente corado com Coomassie Blue(→) que se distinguem facilmente dos espermatozóides que já sofreram reacção acrossómica (\*). A barra representa 10  $\mu$ m.



**Figura 25** Efeito do cloreto de chumbo na integridade do acrossoma após 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

#### **3.3.6.4 Motilidade**

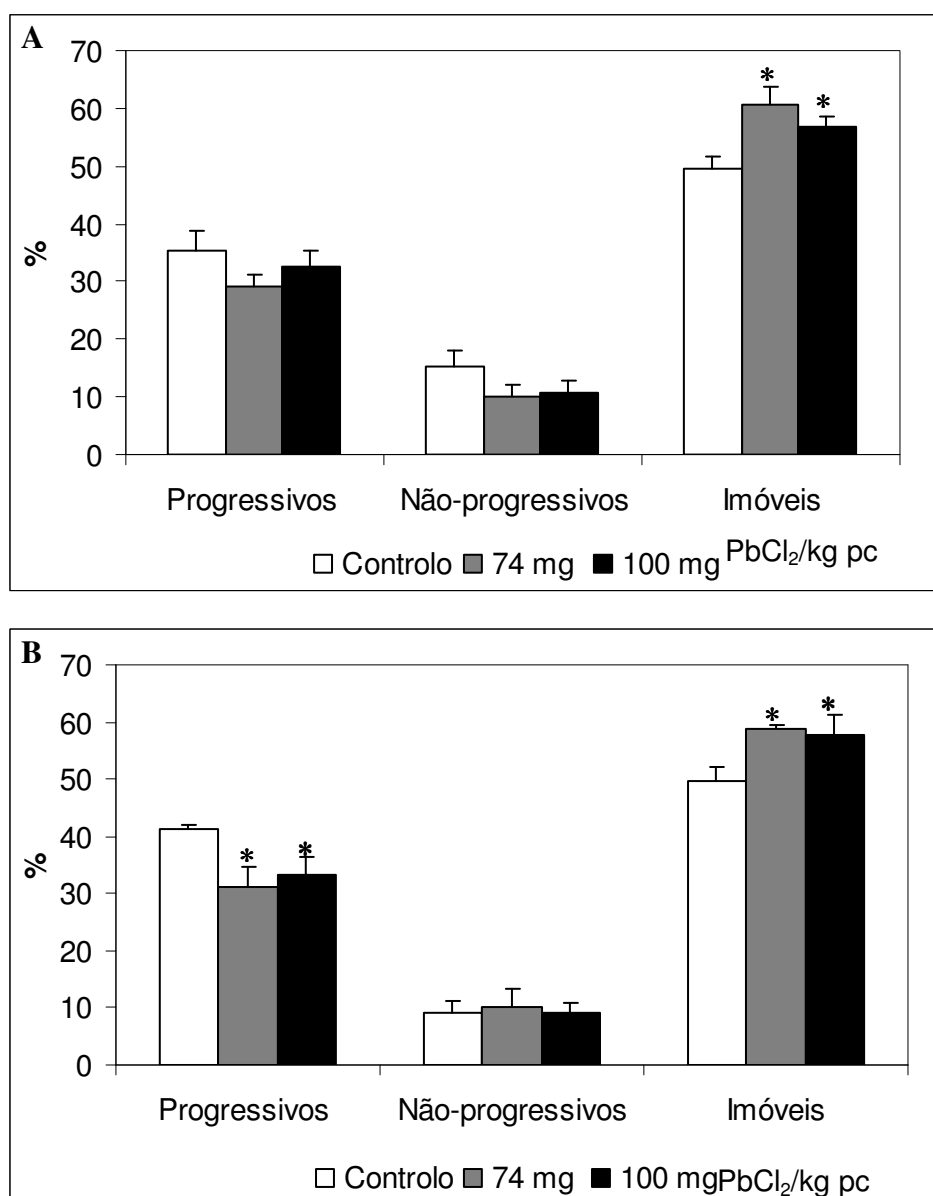
O cloreto de chumbo induziu, em alguns casos, variações significativas na motilidade dos espermatozóides. No grupo de ratinhos sacrificados no dia seguinte à última administração de chumbo (5 dias), foi observado um aumento da percentagem de espermatozóides imóveis, nos animais injectados com ambas as doses de chumbo (Figura 26A). Nos ratinhos sacrificados após 35 dias, observou-se igualmente um aumento da percentagem de espermatozóides imóveis e uma redução da percentagem de espermatozóides móveis progressivos nos ratinhos injectados com 74 e 100 mg de  $PbCl_2/kg$  pc (Figura 26B).

#### **3.3.6.5 Viabilidade**

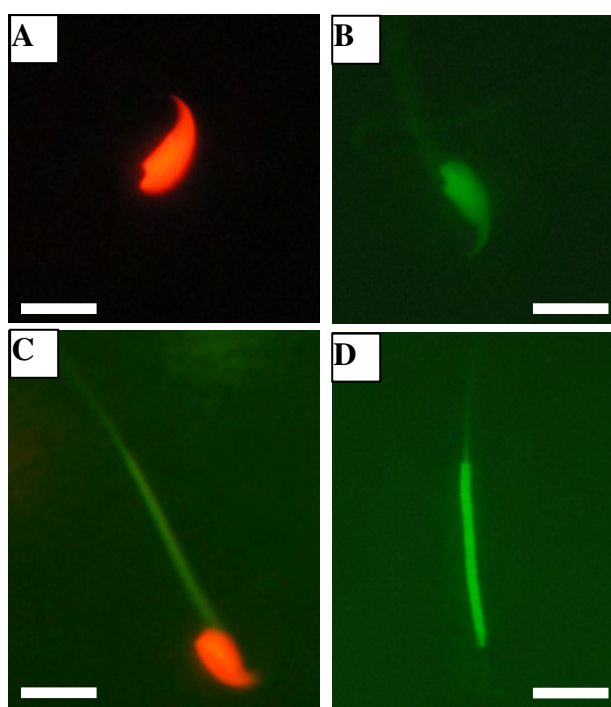
Relativamente à viabilidade dos espermatozóides com marcação com IP/SYBR-14 (Figura 27A e B), não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) neste parâmetro, nos ratinhos injectados com cloretos de chumbo para nenhuma das doses, nem em nenhum dos períodos de avaliação (Figura 28).

#### **3.3.6.6 Função mitocondrial**

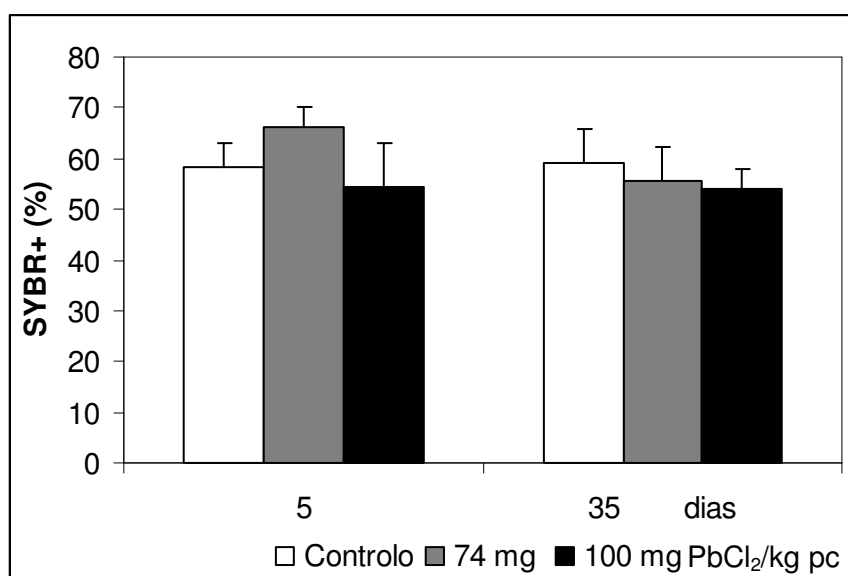
No que concerne à função mitocondrial dos espermatozóides, avaliada pela marcação com Rh123 (Figura 27C e D), não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos ratinhos injectados com cloreto de chumbo para nenhuma das doses, nem em nenhum dos períodos de avaliação (Figura 29).



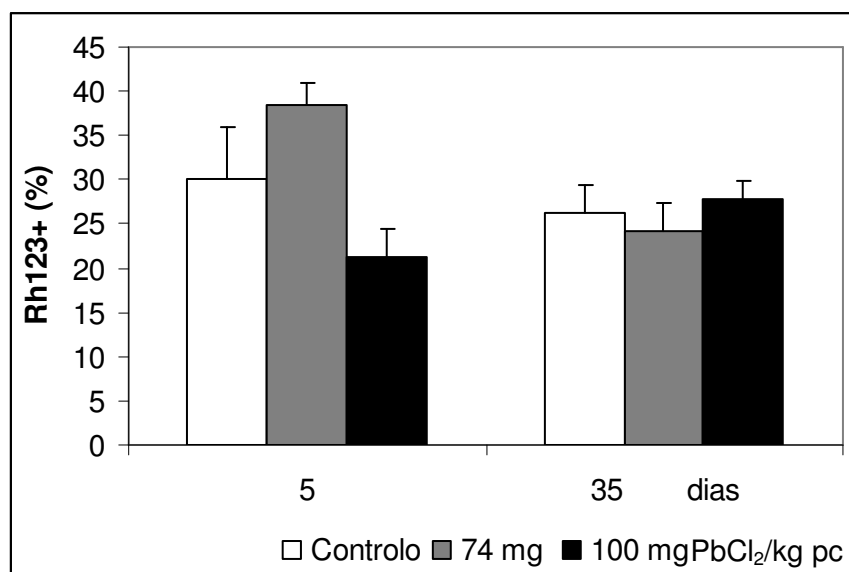
**Figura 26** Efeito do cloreto de chumbo na motilidade dos espermatozóides após 5 dias (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .



**Figura 27** Imagens de microscopia de fluorescência evidenciando: (A) espermatozóide morto marcado positivamente com IP; (B) espermatozóide vivo marcado positivamente com SYBR-14; (C) espermatozóide sem mitocôndrias funcionais, marcado negativamente para Rh123 e com a cabeça marcada positivamente com IP; (D) espermatozóide com mitocôndrias funcionais marcado positivamente com Rh123. A barra representa 10  $\mu$ m.



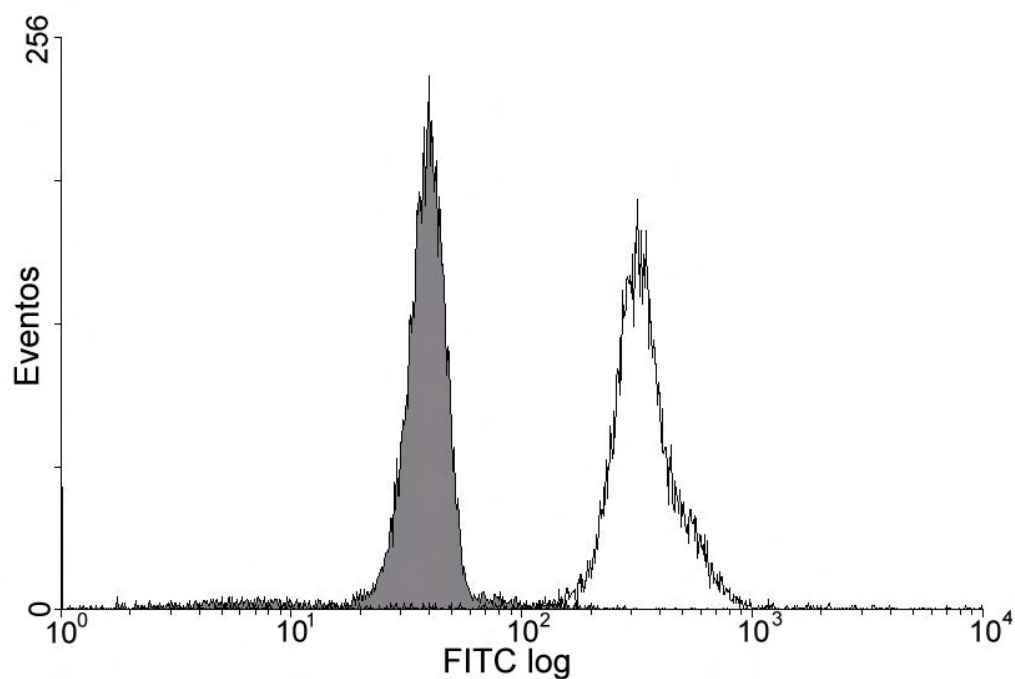
**Figura 28** Efeito do cloreto de chumbo na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.



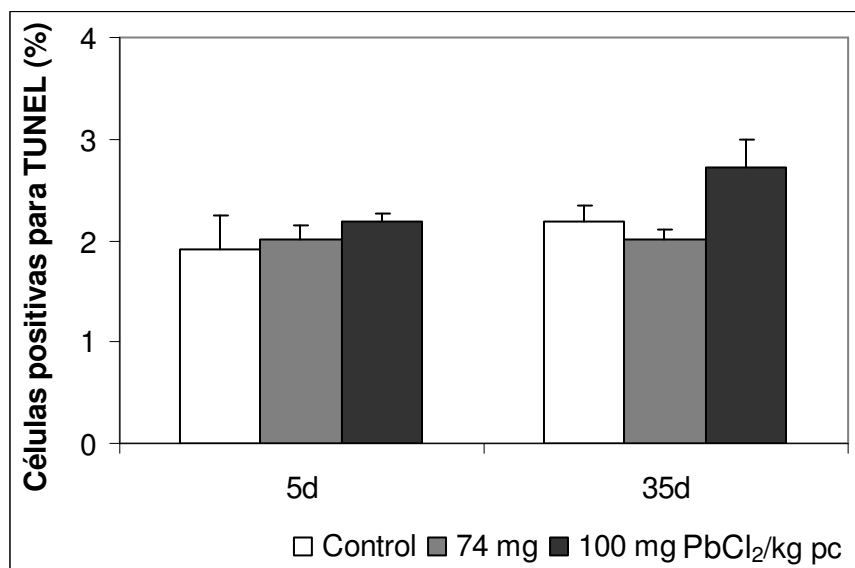
**Figura 29** Efeito do cloreto de chumbo na função mitocondrial dos espermatozoides ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

### 3.3.6.7 TUNEL

A Figura 30 mostra um histograma de TUNEL. Nesta figura, o pico mais à direita é considerado positivo (corresponde ao controlo positivo incubado com DNase I) e o pico mais à esquerda é considerado negativo (corresponde ao controlo negativo incubado na ausência da enzima TdT). O ensaio de TUNEL mostrou que a exposição dos ratinhos a cloreto de chumbo não originou alterações significativas na fragmentação do DNA nos espermatozoides ( $p > 0,05$ ). Este efeito foi observado em ambas as doses e em ambos os períodos de análise (Figura 31).



**Figura 30** Exemplo de um histograma relativo a espermatozóides no ensaio de TUNEL, o pico a cinzento corresponde ao controlo negativo (sem TdT); o pico a branco corresponde ao controlo positivo (incubado com DNase I, com TdT).



**Figura 31** Efeito do cloreto de chumbo na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

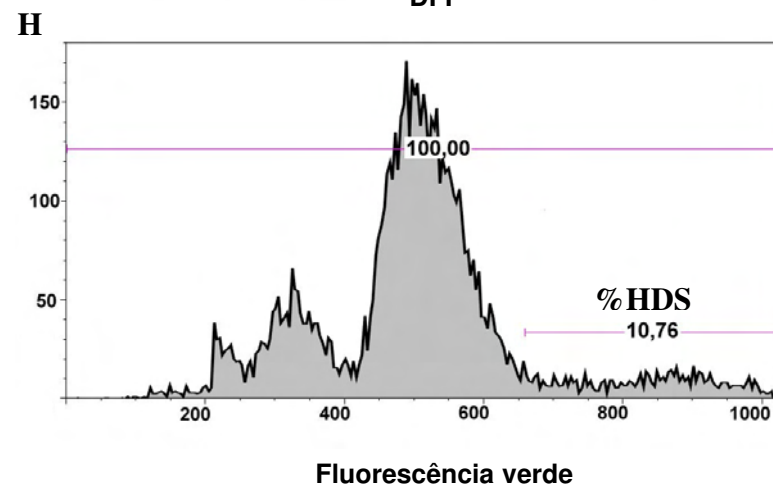
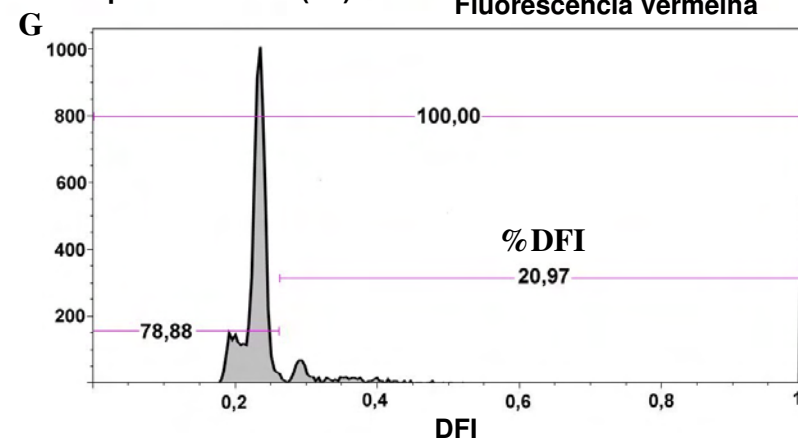
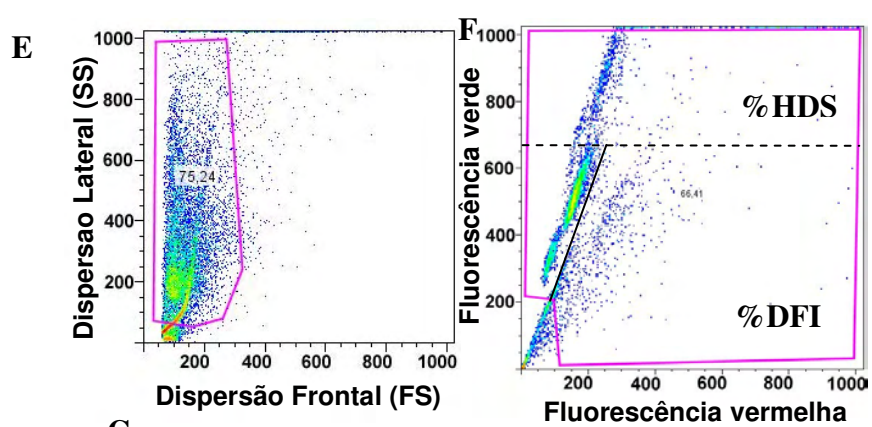
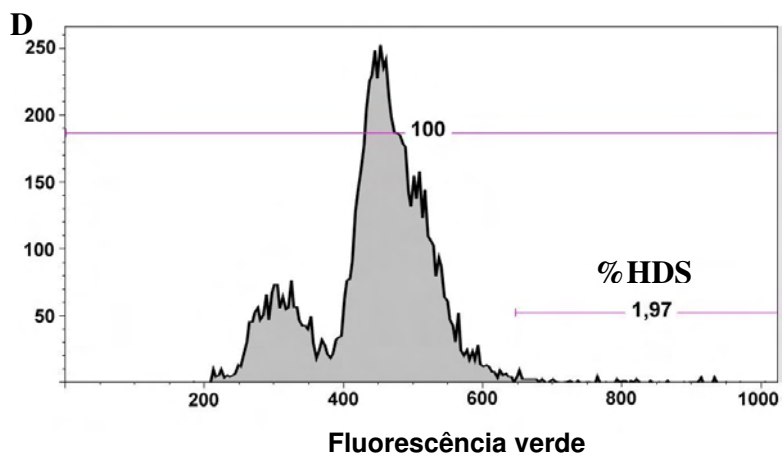
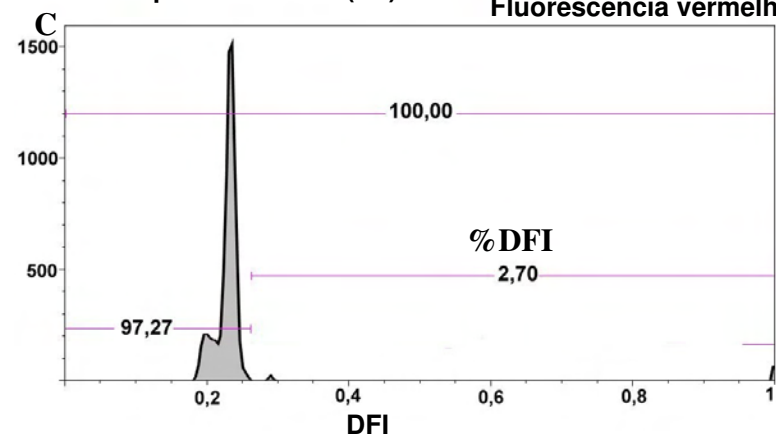
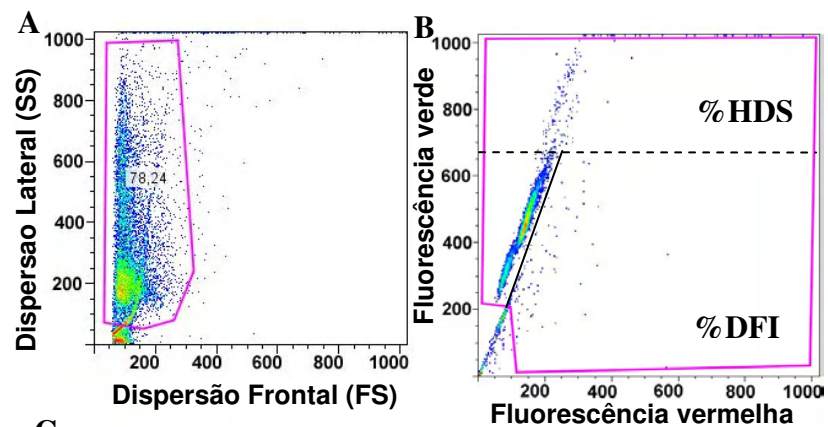


### 3.3.6.8 SCSA

A Figura 32 mostra os resultados de SCSA relativos a duas amostras, com baixa %DFI e elevada %DFI, respectivamente.

A susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida avaliada pelo SCSA não foi afectada pela exposição ao cloreto de chumbo, uma vez que nenhum dos parâmetros avaliados (%DFI, %HDS ou SD-DFI) apresentou variações significativas ( $p < 0,05$ ) nos ratinhos expostos a este composto em nenhum dos períodos em análise (Tabela 9).

**Figura 32** (página seguinte) Resultado do SCSA de uma amostra com baixa %DFI (A, B, C e D) e com elevada %DFI (E,F,G,H). A e E: citograma da dispersão fronal (FS) vs dispersão lateral da luz (SS). A região delimitada a rosa permite eliminar a parte do lixo ("debris"). B e F: citograma que mostra a fluorescência verde (DNA nativo) vs fluorescência vermelha (DNA fragmentado). A região delimitada a rosa permite seleccionar apenas os espermatozóides. A maioria das células agrupa-se num "cluster" com baixa fluorescência vermelha. Para a direita e para baixo deste "cluster" considera-se que as células apresentam %DFI. C e G: Histograma do DFI. Numa população normal, a maioria das células agrupa-se num pico. As células à direita desse pico consideram-se como apresentando %DFI. D e H: Histograma de fluorescência verde. As células mais à direita da população principal (intensa fluorescência verde) consideram-se como apresentando %HDS.



**Tabela 9** Efeitos do cloreto de chumbo na susceptibilidade da cromatina dos espermatozoides à desnaturação ácida, avaliada pelo ensaio SCSA, ao fim de 5 e de 35 dias. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do ensaio SCSA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

	mg PbCl <sub>2</sub> / kg pc	%DFI	DFI-Médio	SD DFI	%HDS
<b>5d</b>	<b>0 (Controlo)</b>	1,76 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,002	7,65 $\pm$ 0,24	3,22 $\pm$ 0,58
	<b>74</b>	2,23 $\pm$ 0,33	0,24 $\pm$ 0,000	8,12 $\pm$ 0,78	2,94 $\pm$ 0,40
	<b>100</b>	1,88 $\pm$ 0,24	0,23 $\pm$ 0,002	7,63 $\pm$ 0,52	2,87 $\pm$ 0,38
<b>35d</b>	<b>0 (Controlo)</b>	1,92 $\pm$ 0,25	0,24 $\pm$ 0,002	3,17 $\pm$ 0,35	7,33 $\pm$ 0,69
	<b>74</b>	1,93 $\pm$ 0,20	0,24 $\pm$ 0,002	3,36 $\pm$ 0,57	7,21 $\pm$ 0,84
	<b>100</b>	2,20 $\pm$ 0,46	0,24 $\pm$ 0,003	2,92 $\pm$ 0,51	8,34 $\pm$ 1,20

### 3.4 Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade do ratinho

#### 3.4.1 Avaliação da taxa de sobrevivência

A administração de cloreto de cádmio nas doses testadas não induziu mortalidade nos animais.

#### 3.4.2 Avaliação dos pesos

Nos animais sacrificados 24 horas após a administração do cloreto de cádmio, não se detectaram alterações significativas do peso do corporal para nenhuma das doses testadas. Por outro lado, as doses de cádmio mais elevadas (2 e 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc) induziram um aumento significativo do peso relativo e absoluto dos testículos após 24 horas ( $p < 0,05$ ). No entanto, o peso

relativo e absoluto dos epidídimos não foi significativamente afectado ( $p>0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10** Efeito do cloreto de cádmio no peso do corpo, testículo e epidídimo dos ratinhos e ainda nas razões peso do testículo/corpo e peso do epidídimo/peso do corpo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p<0,05$ .

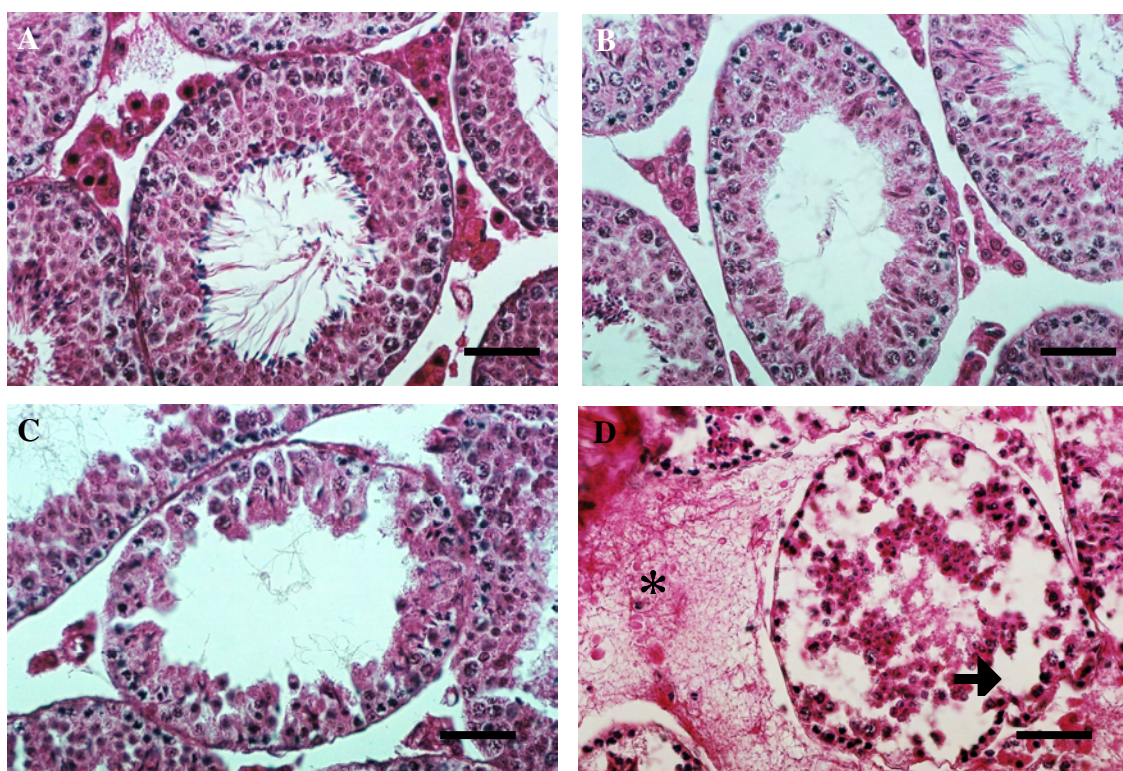
	mgCdCl <sub>2</sub> / kg pc	Peso corpo (g)	Peso testículo (g)	Peso do epidídimo (g)	Peso testículo/ corpo (%)	Peso epidídimo/ corpo (%)
<b>24h</b>	0(Controlo)	33,2 $\pm$ 0,9	0,114 $\pm$ 0,006	0,046 $\pm$ 0,002	0,345 $\pm$ 0,013	0,141 $\pm$ 0,006
	1	33,5 $\pm$ 0,7	0,106 $\pm$ 0,004	0,041 $\pm$ 0,002	0,316 $\pm$ 0,007	0,122 $\pm$ 0,005
	2	33,4 $\pm$ 0,7	0,144 $\pm$ 0,011*	0,045 $\pm$ 0,002	0,435 $\pm$ 0,034*	0,135 $\pm$ 0,006
	3	34,4 $\pm$ 0,6	0,156 $\pm$ 0,008*	0,046 $\pm$ 0,002	0,452 $\pm$ 0,018*	0,132 $\pm$ 0,005
<b>35d</b>	0(Controlo)	41,9 $\pm$ 1,7	0,124 $\pm$ 0,008	0,051 $\pm$ 0,003	0,295 $\pm$ 0,009	0,123 $\pm$ 0,002
	1	42,1 $\pm$ 0,6	0,128 $\pm$ 0,007	0,063 $\pm$ 0,004	0,303 $\pm$ 0,017	0,150 $\pm$ 0,010
	2	42,8 $\pm$ 1,3	0,058 $\pm$ 0,017*	0,047 $\pm$ 0,004	0,136 $\pm$ 0,041*	0,111 $\pm$ 0,010
	3	43,7 $\pm$ 2,2	0,023 $\pm$ 0,003*	0,031 $\pm$ 0,003*	0,053 $\pm$ 0,008*	0,072 $\pm$ 0,009*

Tal como se verificou para os animais sacrificados 24 horas após a administração do cloreto de cádmio, também nos animais sacrificados após 35 dias não se verificaram alterações significativas do peso corporal ( $p>0,05$ ). Contrariamente ao verificado após 24 horas, após 35 dias observou-se uma diminuição significativa do peso absoluto e relativo do testículo nas doses de 2 e 3 mg de cloreto de cádmio. O peso absoluto do epidídimo também diminuiu significativamente em relação ao controlo na dose de 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc.

Do mesmo modo, os pesos relativos dos testículos e epidídimos também diminuíram comparativamente ao controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

### 3.4.3 Análise histológica do testículo e epidídimo

O tratamento com cloreto de cádmio na dose mais baixa (1 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ ) não induziu alterações histológicas no epitélio seminífero (Figura 33). Contudo, as concentrações mais elevadas de cloreto de cádmio (2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ ) induziram severas alterações histológicas nos tubos seminíferos, nomeadamente hemorragia e edema intersticial, ruptura do epitélio germinativo com descamação de células para o lúmen, sobretudo na dose mais elevada.



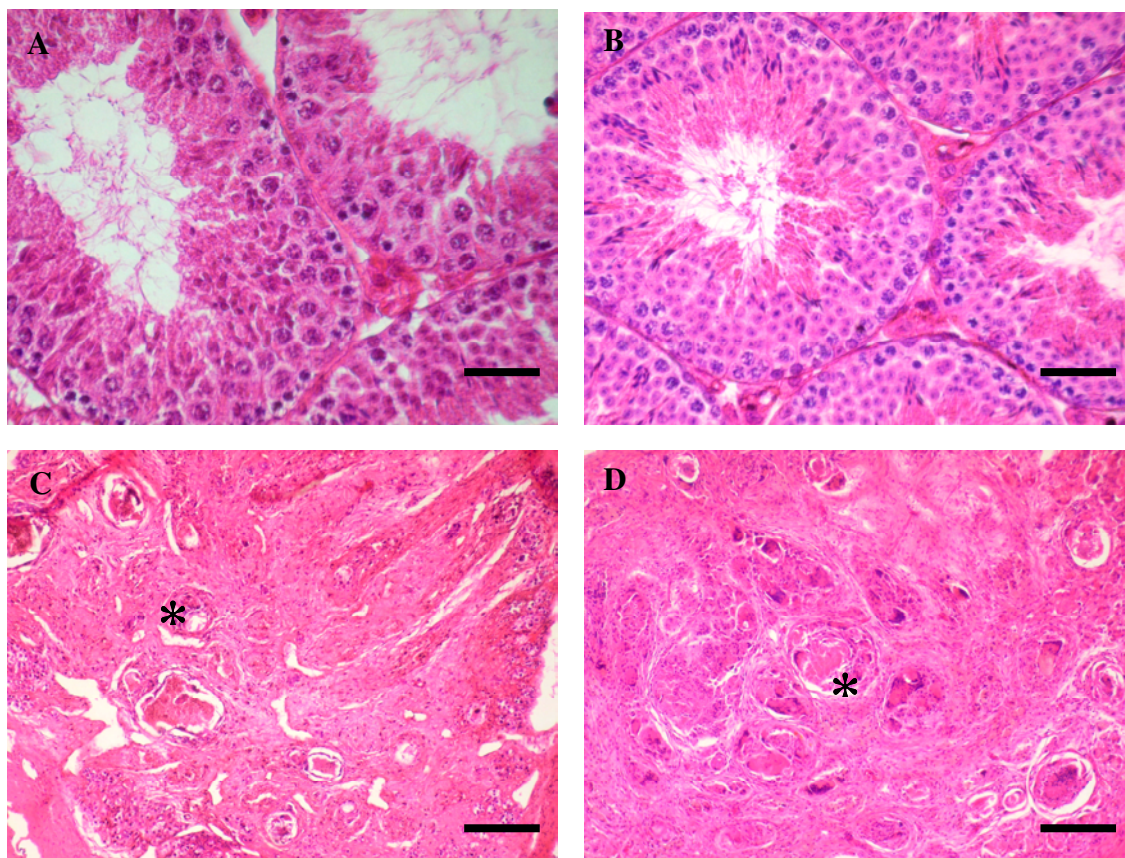
**Figura 33** Efeito do cloreto de cádmio na histologia do testículo ao fim de 24 horas (A) controlo, (B) 1 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (C) 2 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (D) 3 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ . H&E. \* edema intersticial. → ruptura do epitélio germinativo. A barra representa 40  $\mu\text{m}$ .

A dose de 1 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  não induziu alterações significativas na histologia do testículo quer após 24 horas, quer após 35 dias. Por outro lado, as

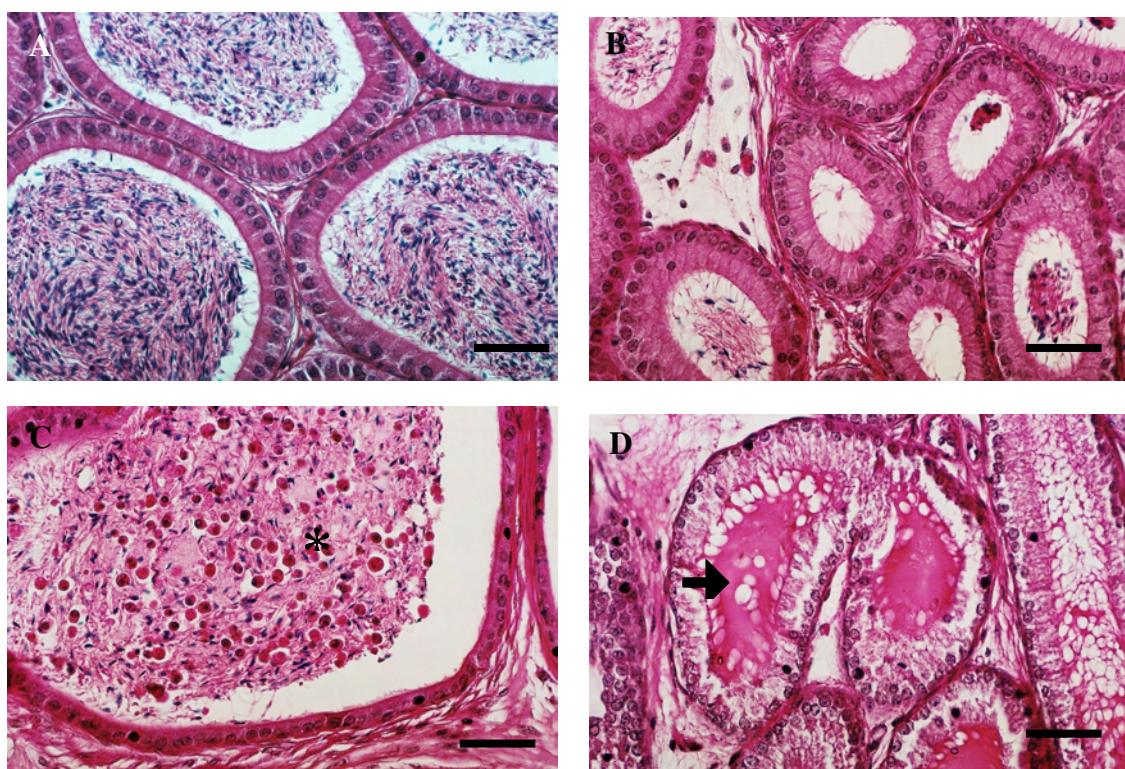


doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  induziram necrose severa do testículo, com completa desorganização da estrutura testicular, desaparecimento das células germinativas e dos espermatozóides localizados centralmente no lúmen dos tubos seminíferos (Figura 34).

Relativamente à histologia do epidídimo 24 horas após a exposição ao cloreto de cádmio, não se observaram alterações significativas na dose de 1 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  (Figura 35). Nas doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  observou-se a presença de células imaturas e presença de fluido eosinófilo no lúmen do epidídimo. Ao fim de 35 dias, apenas se verificaram alterações na histologia do epidídimo nas doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , com a presença de um número reduzido de espermatozóides na zona do corpo e cauda e da presença de fluido e resíduos eosinófilos no lúmen epidídimo (Figura 36).



**Figura 34** Efeito do cloreto de cádmio na histologia do testículo ao fim de 35 dias (A) controlo, (B) 1 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (C) 2 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (D) 3 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ . Coloração H&E. \* necrose testicular. A barra representa 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura 35** Efeito do cloreto de cádmio na histologia do epidídimo ao fim de 24 horas (A) controle, (B) 1 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (C) 2 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , (D) 3 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ . H&E. \* células imaturas no epidídimo; → fluido eosinófilo. A barra representa 40  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.3.1 Estudo morfométrico dos tubos seminíferos

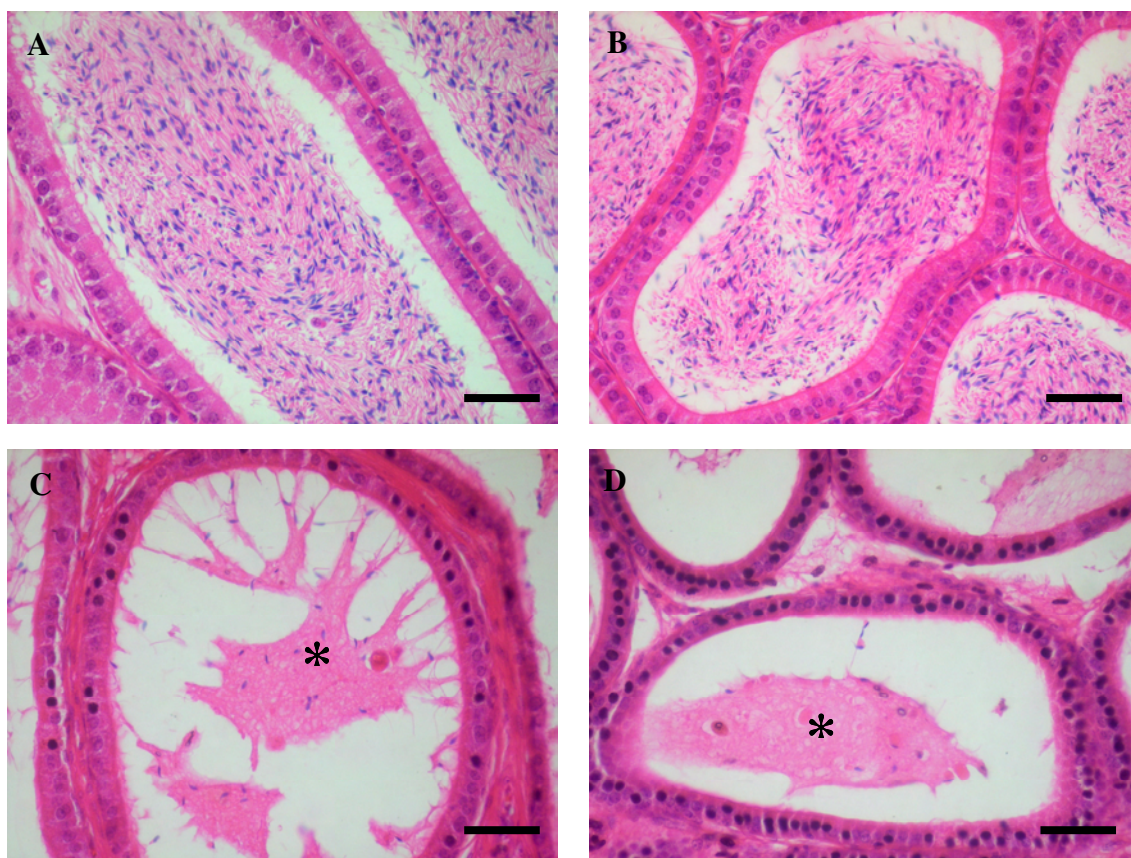
O cloreto de cádmio induziu uma diminuição significativa do diâmetro dos tubos seminíferos (Figura 37), visível 24 horas após a administração do composto ( $p < 0,001$ ). Esta atrofia dos tubos seminíferos foi mais evidente com o aumento da concentração de cloreto de cádmio.

#### 3.4.4 Quantificação dos níveis de cádmio no testículo

Os níveis de cádmio nos testículos aumentaram significativamente com a exposição a cloreto de cádmio ( $p < 0,001$ ), sendo maior a acumulação nos tecidos em função da dose administrada ( $y = 0,095x - 0,0584$ ;  $r^2 = 0,9102$ ) (Figura 38). Para a dose de 1 mg  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  a concentração de cádmio aumentou

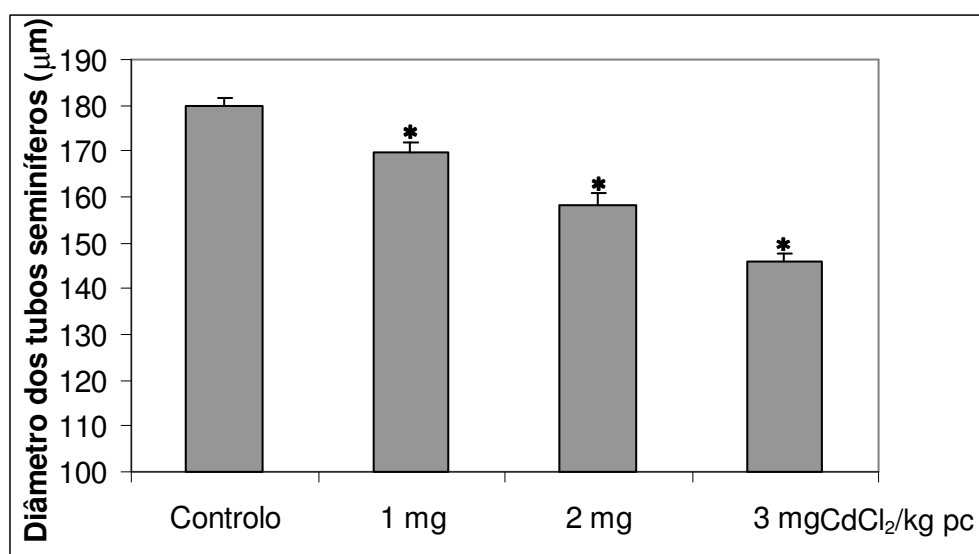


185 vezes relativamente ao controlo, enquanto que para as doses de 2 e 3 mg o aumento foi de 226 e 304 vezes, respectivamente.

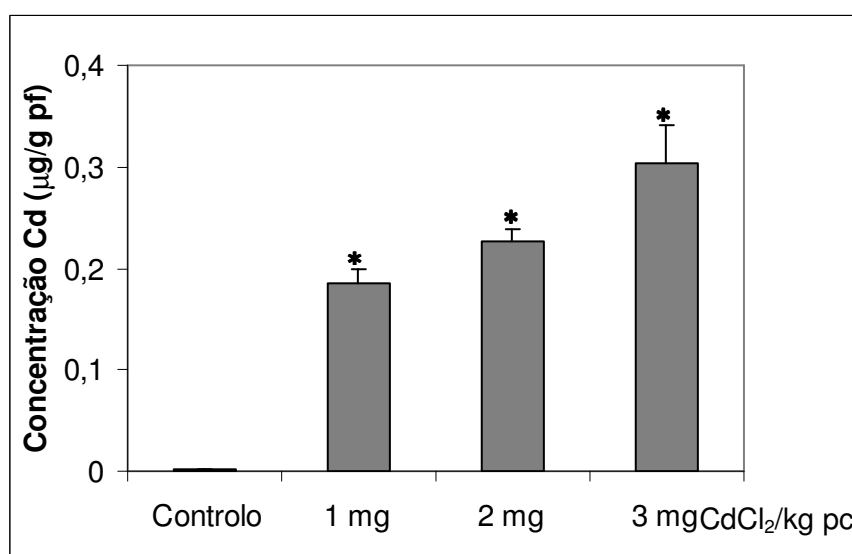


**Figura 36** Efeito do cloreto de cádmio na histologia do epidídimo ao fim de 35 dias (A) controlo, (B) 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (C) 2 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, (D) 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. H&E. \* fluido e resíduos eosinófilos A barra representa 40 μm.





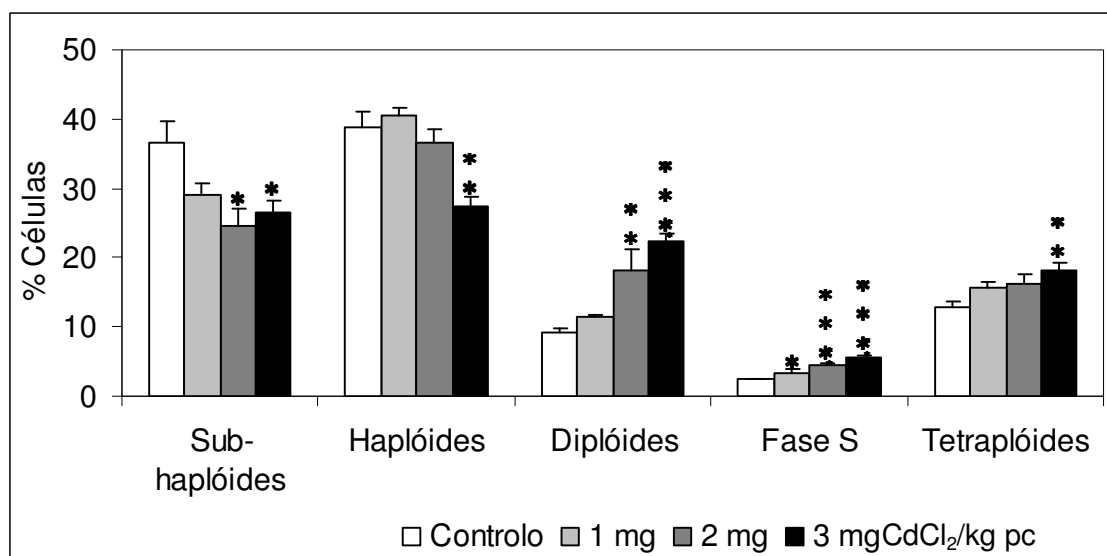
**Figura 37** Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos administrados com 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 24 horas após o início da exposição. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente à amostra controlo para  $p < 0,001$ .



**Figura 38** Concentração dos níveis de cádmio nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 24 horas após o início da exposição. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente à amostra controlo para  $p < 0,001$ .

### 3.4.5 Análise do conteúdo em DNA das células do testículo

A análise das células do testículo por citometria de fluxo mostrou que a percentagem relativa de células sub-haplóides (espermatídeos alongados) foi significativamente reduzida após a administração de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p<0,05$ ) (Figura 39). A dose de 3 mg induziu uma diminuição da percentagem de células haplóides (espermatídeos redondos) ( $p<0,005$ ). Simultaneamente, verificou-se um aumento da percentagem de células com conteúdo em DNA diplóide, após o tratamento com 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p<0,005$  e  $p<0,001$ , respectivamente). O mesmo se verificou para os núcleos em fase S, mas neste caso para todas as doses de cádmio administradas ( $p<0,05$  para a dose de 1mg e  $p<0,001$  para 2 e 3 mg). No que diz respeito às células tetraplóides observou-se um aumento da sua percentagem relativa, mas neste caso apenas para a dose de 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p<0,005$ ).



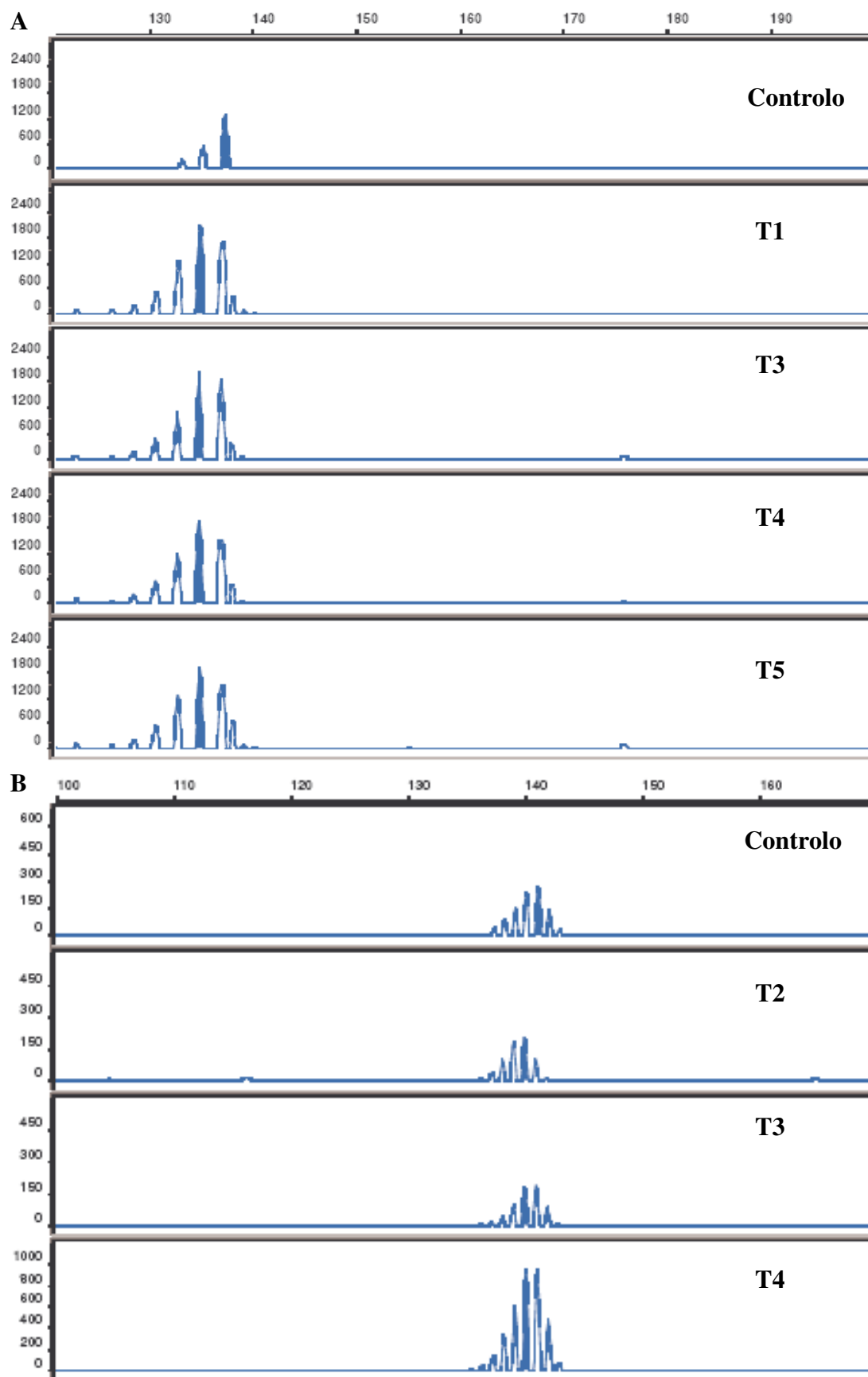
**Figura 39** Percentagens de núcleos de células germinativas isolados de testículos de ratinhos controlo e administrados com cloreto de cádmio ao fim de 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os símbolos \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p<0,05$ ,  $p<0,005$  e  $p<0,001$ , respectivamente.

### 3.4.6 Análise da Instabilidade de microssatélites no testículo

Dos seis marcadores testados neste trabalho, apenas em cinco (Mus 1, Mus 3, Mus 4, Mus 5 e Mus 6) se observaram amplificações de uma forma consistente. Por conseguinte, o marcador Mus 2 não foi considerado para análise. Os padrões alélicos das amostras expostas a cádmio foram comparados com os respectivos controlos e, seguidamente, classificados como IMS-positivo, no caso de ser encontrado um ou mais novo alelo (mutação) (Figura 40).

Neste trabalho apenas foram encontradas amostras IMS-positivas nos ratinhos sacrificados após 35 dias expostos a 1 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc. A Tabela 11 mostra as amostras classificadas como IMS positivas. Duas das amostras IMS positivas (T3 e T4) foram classificadas como apresentando um elevado IMS ( $\geq 40\%$ ), enquanto que outras foram classificadas como apresentando baixo IMS ( $< 40\%$ ). As restantes foram classificadas como apresentando estabilidade de microssatélites. Esta classificação foi efectuada de acordo com as indicações do "National Cancer Institute (NCI) Workshop-Revised Bethesda Guidelines" (Boland et al, 1998; Umar et al, 2004).

**Figura 40** (página seguinte) Exemplos de IMS observados nas amostras de ratinhos expostos a CdCl<sub>2</sub>. O tamanho do alelo predominante (a cheio) das amostras controlo foi comparado com o das amostras tratadas com cloreto de cádmio nos marcadores (A) Mus 1 e (B) Mus 5. A escala no topo das figuras indica o tamanho dos fragmentos e a escala à esquerda indica a intensidade da fluorescência, medida em unidades relativas de fluorescência. As amostras T1, T2, T3, T4 e T5 correspondem a amostras de testículo de ratinhos administrados com 1 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc.



**Tabela 11** Análise das amostras que apresentaram IMS (mutações) com os marcadores testados. As amostras T1 a T5 correspondem a amostras de testículo de ratinhos administrados com 1 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados após 35 dias.

Alterações no tamanho dos alelos (pb) <sup>a</sup>								
(mgCdCl <sub>2</sub> /kg pc)	Amostra	Mus 1	Mus 3	Mus 4	Mus 5	Mus 6	%IMS	Classificação IMS
1	T1	-2	0	0	0	0	20	Baixo
	T2	0	0	0	-1	0	20	Baixo
	T3	-2	0	0	-1	0	40	Elevado
	T4	-2	0	0	-1	0	40	Elevado
	T5	-2	0	0	0	0	20	Baixo
<b>Sensibilidade <sup>b</sup></b>		80%	0%	0%	60%	0%		

<sup>a</sup> As alterações foram calculadas por comparação com o tamanho do alelo predominante observado nas amostras de ratinhos administrados com cloreto de cádmio e as controlo.

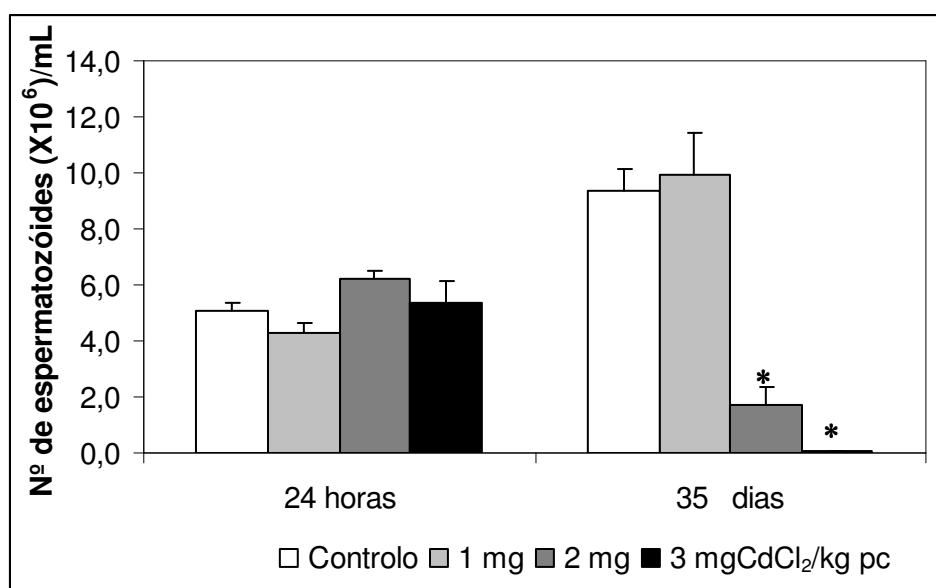
<sup>b</sup> A sensibilidade do marcador corresponde à percentagem de amostras com IMS.

### 3.4.7 Análise dos efeitos na função espermática

Com objectivo de avaliar o efeito do cloreto de cádmio na função espermática foi avaliado um vasto conjunto de parâmetros nos ratinhos injectados com 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg de peso corporal.

#### 3.4.7.1 Densidade

A densidade de espermatozóides avaliada nos ratinhos expostos a 1, 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados 24 horas após a administração do composto não foi significativamente afectada por nenhuma das doses, contrariamente ao verificado nos ratinhos sacrificados após 35 dias em que se verificou uma redução drástica da densidade de espermatozóides ( $p < 0,001$ ) (Figura 41).



**Figura 41** Efeito do cloreto de cádmio na densidade de espermatozóides ao fim de 24 horas e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa para mesmo parâmetro entre amostras de ratinhos controlo e tratados com 1, 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  para  $p < 0,001$ .

### 3.4.7.2 Morfologia

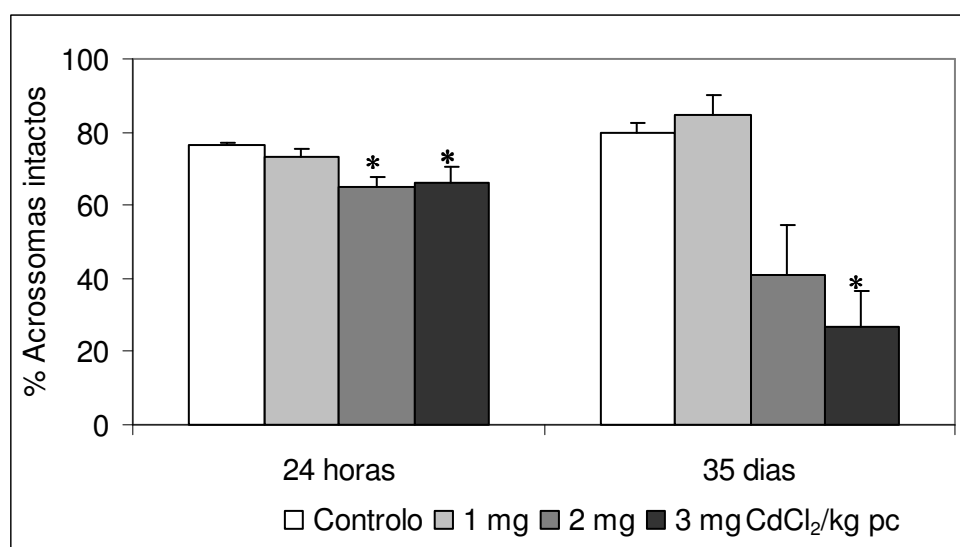
No que concerne à morfologia dos espermatozóides, observou-se uma diminuição significativa da percentagem de espermatozóides com morfologia normal nos ratinhos administrados com 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  e sacrificados após 24 horas. Simultaneamente, para as mesmas doses, observou-se um aumento da percentagem de células com anomalias na cabeça (Tabela 12). Trinta e cinco dias após a exposição ao cloreto de cádmio observou-se igualmente uma redução da percentagem de espermatozóides com morfologia normal e um aumento da incidência de anomalias na cabeça para as doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , apesar de na dose mais elevada as diferenças não serem estatisticamente significativas. Por outro lado, esta dose induziu um aumento significativo da incidência de anomalias na cauda (Tabela 12).

**Tabela 12** Efeito do cloreto de cádmio na morfologia dos espermatozóides após 24 horas e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolos \* e \*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

		Controlo	1 mg	2 mg	3 mg
24 horas	Morfologia Normal (%)	83,7 $\pm$ 1,4	79,3 $\pm$ 1,5	68,8 $\pm$ 1,8**	72,4 $\pm$ 2,0*
	Anomalias cabeça (%)	7,6 $\pm$ 0,4	8,9 $\pm$ 1,5	15,2 $\pm$ 1,4*	13,0 $\pm$ 1,7*
	Anomalias cauda (%)	7,9 $\pm$ 1,1	11,0 $\pm$ 0,6	14,9 $\pm$ 1,0	13,1 $\pm$ 3,7
	Anomalias peça intermediária (%)	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
	Anomalias múltiplas (%)	0,6 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2
35 dias	Morfologia Normal (%)	79,2 $\pm$ 2,4	78,5 $\pm$ 2,1	62,8 $\pm$ 3,3*	61,0 $\pm$ 10,5*
	Anomalias cabeça (%)	5,1 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 1,3	11,9 $\pm$ 1,5*	11,4 $\pm$ 4,3
	Anomalias cauda (%)	10,5 $\pm$ 1,2	7,9 $\pm$ 1,8	16,7 $\pm$ 4,6	18,5 $\pm$ 2,1*
	Anomalias peça intermediária (%)	4,1 $\pm$ 2,1	2,7 $\pm$ 1,6	6,9 $\pm$ 4,9	8,1 $\pm$ 6,0
	Anomalias múltiplas (%)	1,1 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 1,3	0,9 $\pm$ 0,6

#### 3.4.7.3 Integridade do acrossoma

A administração de cloreto de chumbo induziu uma diminuição significativa da percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro, sobretudo nas doses mais elevadas, ao fim de 24 horas. Ao fim de 35 dias, foi observado o mesmo efeito, contudo, devido à grande variabilidade dos resultados para as doses de 2 e 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, as diferenças apenas se mostraram significativas para a dose mais elevada (Figura 42).



**Figura 42** Efeito do cloreto de cádmio na integridade do acrossoma após 24 horas e 35 dias. Os valores representam a média ± erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

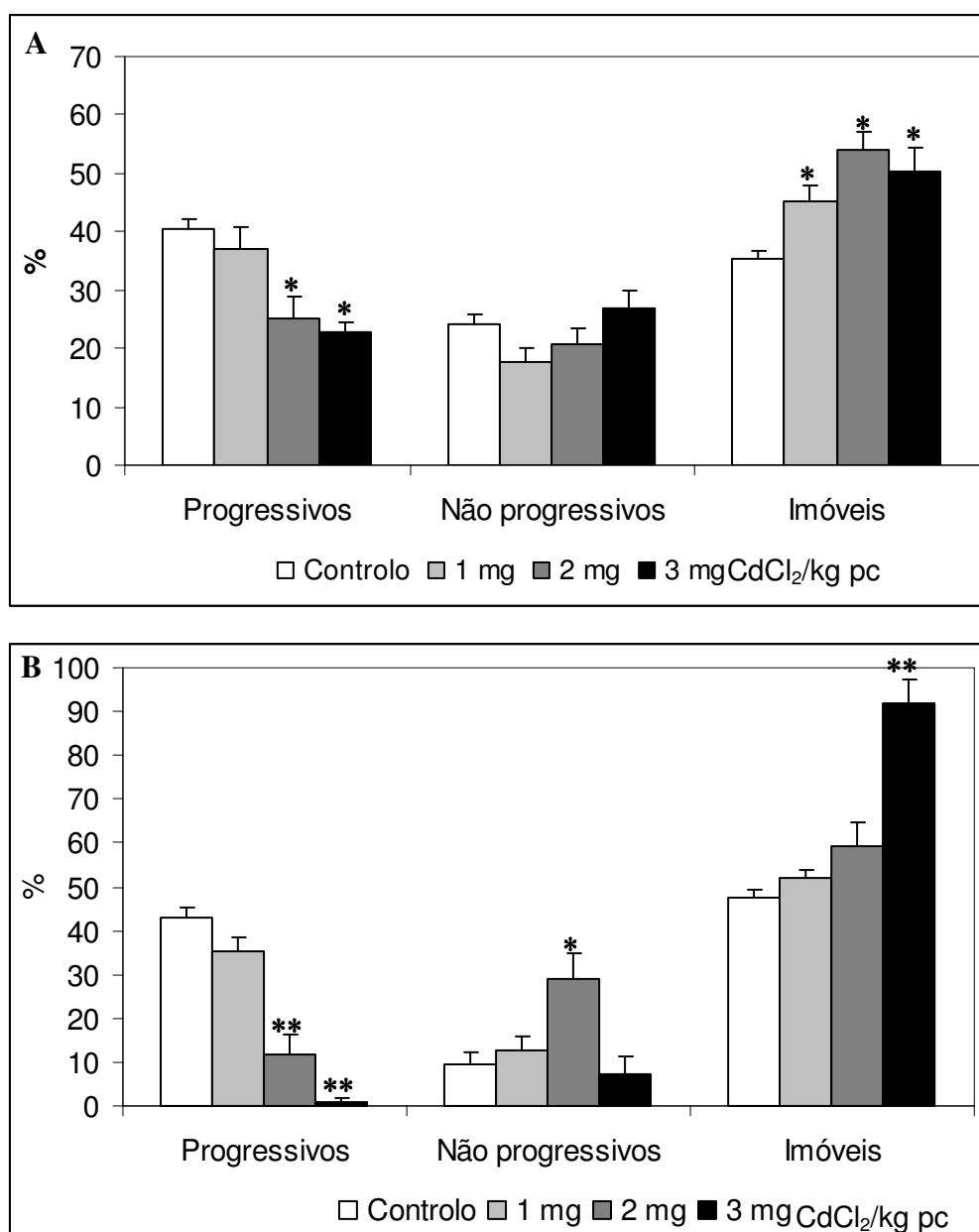
#### 3.4.7.4 Motilidade

O cloreto de cádmio induziu variações significativas na motilidade dos espermatozóides, quer após 24 horas, quer após 35 dias (Figura 43).

Após 24 horas, observou-se uma redução significativa da percentagem de espermatozóides progressivos para as doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  e, simultaneamente, um aumento significativo da percentagem de espermatozóides imóveis para as doses de 2 e 3 mg e também para a dose de 1 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p < 0,05$ ).

Após 35 dias, observou-se igualmente uma redução muito significativa ( $p < 0,001$ ) da percentagem de espermatozóides progressivos para as doses de 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ . Simultaneamente, detectou-se um aumento significativo da percentagem de espermatozóides não progressivos para a dose de 2 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p < 0,05$ ) e da percentagem de imóveis para a dose de 3 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$  ( $p < 0,001$ ).



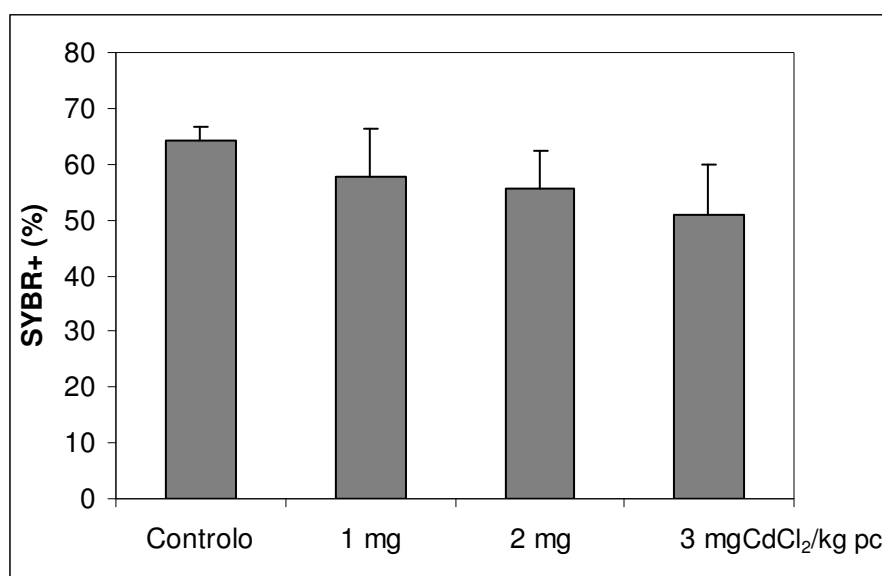


**Figura 43** Efeito do cloreto de cádmio na motilidade dos espermatozóides ao fim de 24 horas (A) e ao fim de 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam diferenças significativas relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

#### 3.4.7.5 Viabilidade

No que diz respeito à viabilidade dos espermatozóides por marcação com PI/SYBR-14 (Figura 27 A e B), não foram observadas diferenças

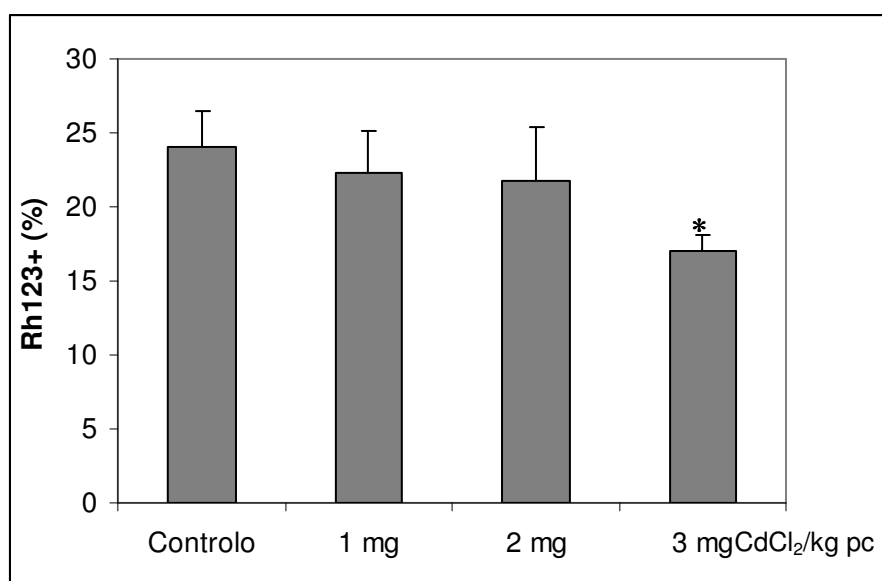
significativas ( $p>0,05$ ) neste parâmetro, nos ratinhos injectados com cloreto de cádmio e sacrificados após 24 horas, para nenhuma das doses testadas (Figura 44) .



**Figura 44** Efeito do cloreto de cádmio na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

#### 3.4.7.6 Função mitocondrial

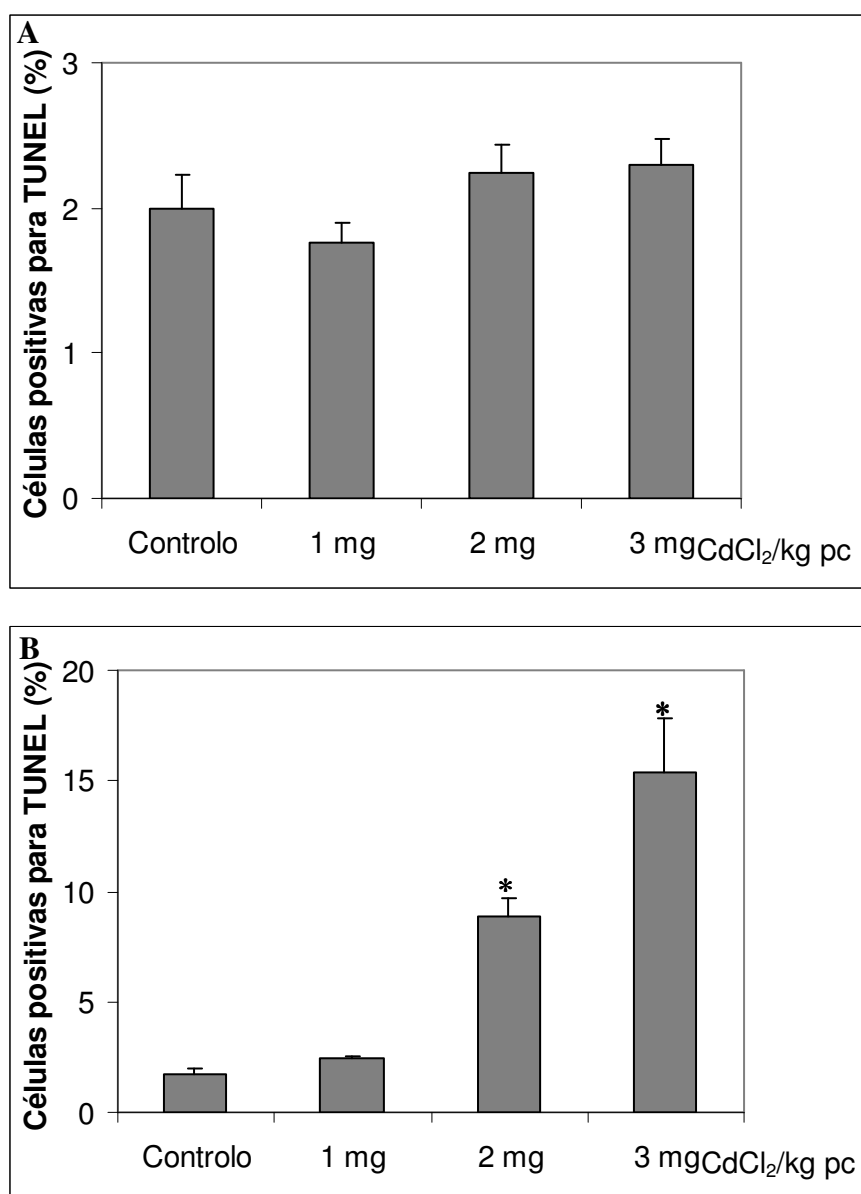
No que diz respeito à função mitocondrial dos espermatozóides, avaliada pela marcação com Rh123 (Figura 27 C e D), observou-se uma redução significativa ( $p<0,05$ ) da percentagem de espermatozóides com mitocôndrias funcionalmente activas nos ratinhos administrados com 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc e sacrificados após 24 horas (Figura 45).



**Figura 45** Efeito do cloreto de cádmio na função mitocondrial dos espermatozóides ao fim de 24 horas. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

#### 3.4.7.7 TUNEL

A exposição dos ratinhos a cloreto de cádmio não originou alterações significativas na fragmentação do DNA nos espermatozóides dos ratinhos sacrificados 24 horas após a exposição ( $p > 0,05$ ) (Figura 46A). Nos ratinhos sacrificados 35 dias após a exposição ao cloreto de cádmio observou-se um aumento significativo da percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA, para as doses de 2 e 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc ( $p < 0,001$ ) (Figura 46B).



**Figura 46** Efeito do cloreto de cádmio na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL, ao fim de 24 horas (A) e ao fim de 35 dias (B). Em (A) a avaliação foi efectuada por citometria de fluxo e em (B) por microscopia de fluorescência. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,001$ .

### 3.4.7.8 SCSA

Com excepção de uma redução do DFI-médio nos espermatozóides dos ratinhos administrados com 2 mg de  $\text{CdCl}_2/\text{kg pc}$ , nenhum outro parâmetro indicativo da susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida, avaliado pelo SCSA (%DFI, %HDS ou SD-DFI) foi afectado pela exposição ao cloreto de cádmio (Tabela 13).

**Tabela 13** Efeitos do cloreto de cádmio na susceptibilidade da cromatina dos espermatozóides à desnaturação ácida avaliada pelo ensaio SCSA ao fim de 24 horas. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do ensaio SCSA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

mg $\text{CdCl}_2$ / kg pc		%DFI	DFI-Médio	SD DFI	%HDS
0 (Controlo)		$3,17 \pm 0,487$	$0,66 \pm 0,05$	$32,81 \pm 0,96$	$3,93 \pm 0,94$
24 horas	1	$3,00 \pm 0,372$	$0,59 \pm 0,04$	$30,53 \pm 2,60$	$2,65 \pm 0,45$
	2	$3,72 \pm 0,349$	$0,44 \pm 0,03^*$	$25,88 \pm 2,02$	$2,12 \pm 0,49$
	3	$2,78 \pm 0,344$	$0,56 \pm 0,05$	$30,54 \pm 1,41$	$2,65 \pm 0,33$

### 3.5 Efeitos do cromato de potássio na fertilidade do ratinho

#### 3.5.1 Avaliação da taxa de sobrevivência

A administração de cromato de potássio nas doses testadas não induziu mortalidade nos animais.

#### 3.5.2 Avaliação dos pesos

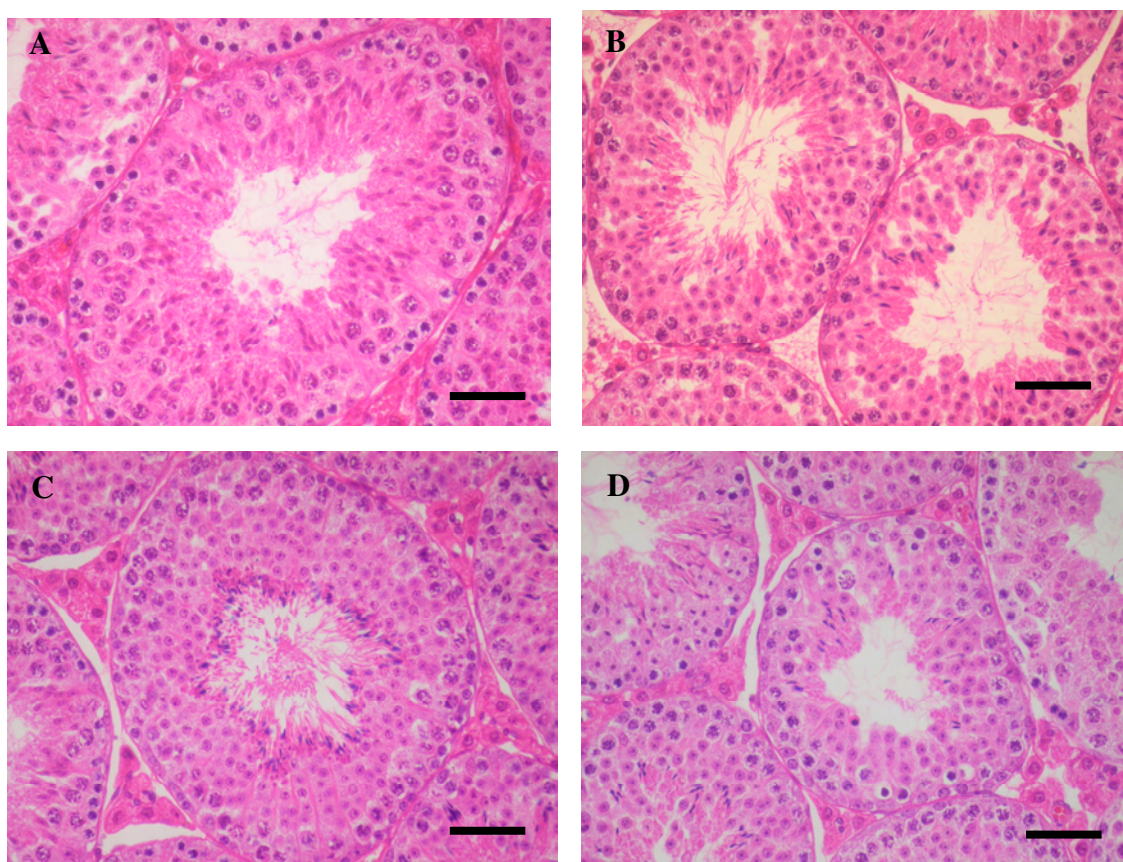
A administração de cromato de potássio durante quatro dias não induziu alterações significativas quer no peso dos ratinhos, quer nos pesos absolutos ou relativos do testículo e do epidídimo, quer ao fim de 5 dias, quer ao fim de 35 dias ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** Efeito do cromato de potássio no peso do corpo, testículo e epidídimo dos ratinhos e ainda nas razões peso do testículo/corpo e peso do epidídimo/peso do corpo. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

	mgK <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> / kg pc	Peso corpo (g)	Peso testículo (g)	Peso do epidídimo (g)	Peso testículo/ corpo (%)	Peso epidídimo/ corpo (%)
5d	0(Controlo)	38,5 $\pm$ 0,7	0,124 $\pm$ 0,003	0,052 $\pm$ 0,001	0,322 $\pm$ 0,010	0,136 $\pm$ 0,005
	5	35,8 $\pm$ 0,7	0,115 $\pm$ 0,005	0,045 $\pm$ 0,003	0,321 $\pm$ 0,014	0,131 $\pm$ 0,011
	10	35,9 $\pm$ 0,9	0,122 $\pm$ 0,005	0,053 $\pm$ 0,001	0,349 $\pm$ 0,030	0,154 $\pm$ 0,007
35d	0(Controlo)	38,8 $\pm$ 1,1	0,138 $\pm$ 0,008	0,051 $\pm$ 0,004	0,355 $\pm$ 0,013	0,131 $\pm$ 0,008
	5	40,9 $\pm$ 1,2	0,142 $\pm$ 0,005	0,056 $\pm$ 0,002	0,350 $\pm$ 0,018	0,135 $\pm$ 0,007
	10	42,0 $\pm$ 0,9	0,132 $\pm$ 0,010	0,057 $\pm$ 0,004	0,308 $\pm$ 0,028	0,129 $\pm$ 0,007

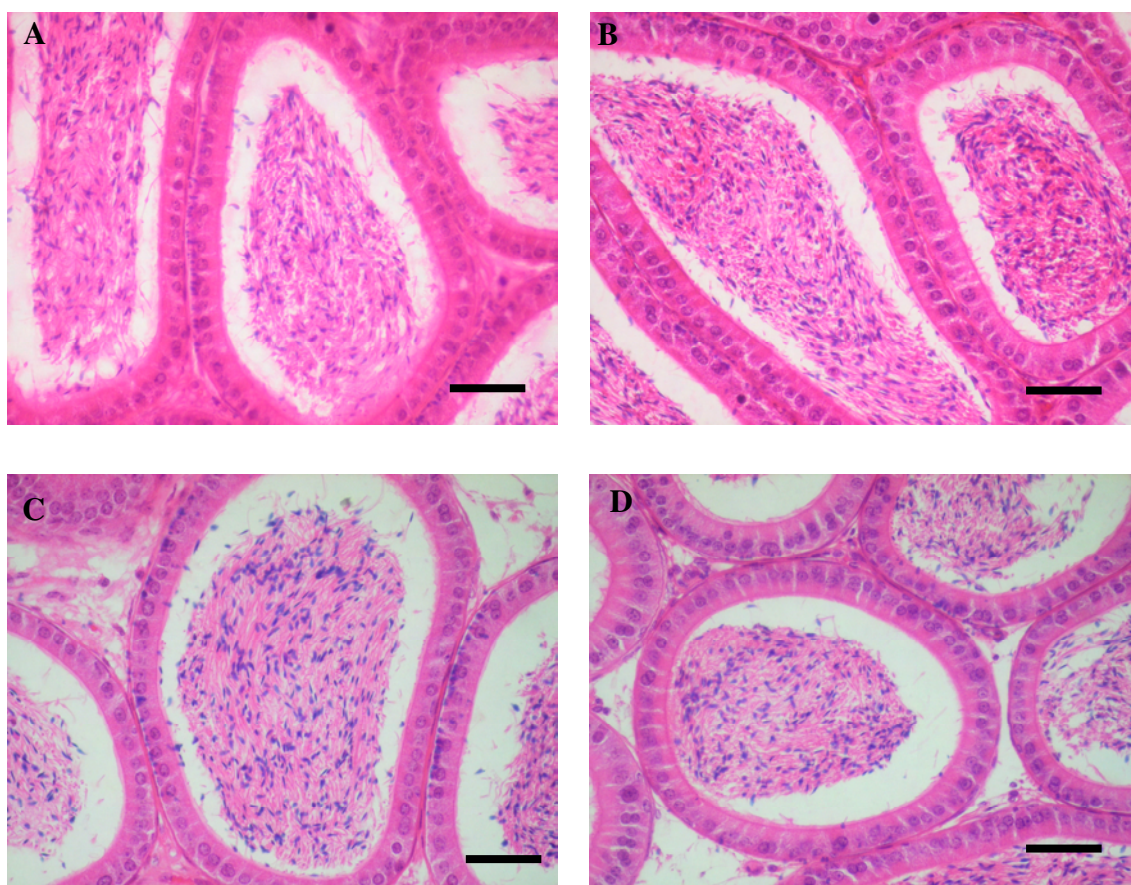
### 3.5.3 Análise histológica do testículo e epidídimo

A Figura 47 mostra que a exposição a cromato de potássio durante 4 dias consecutivos não induziu alterações histológicas nos testículos dos ratinhos nos dois períodos estudados.



**Figura 47** Efeito do cromato de potássio na histologia do testículo após 5 dias (A) controle, (B) 10 mg K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc e após 35 dias (C) controle, (D) 10 mg K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc. H&E. A barra representa 40 μm.

Tal como se verificou para o testículo, a histologia do epidídimo também não se mostrou afectada pela exposição a cromato de potássio, em nenhum dos períodos (Figura 48).

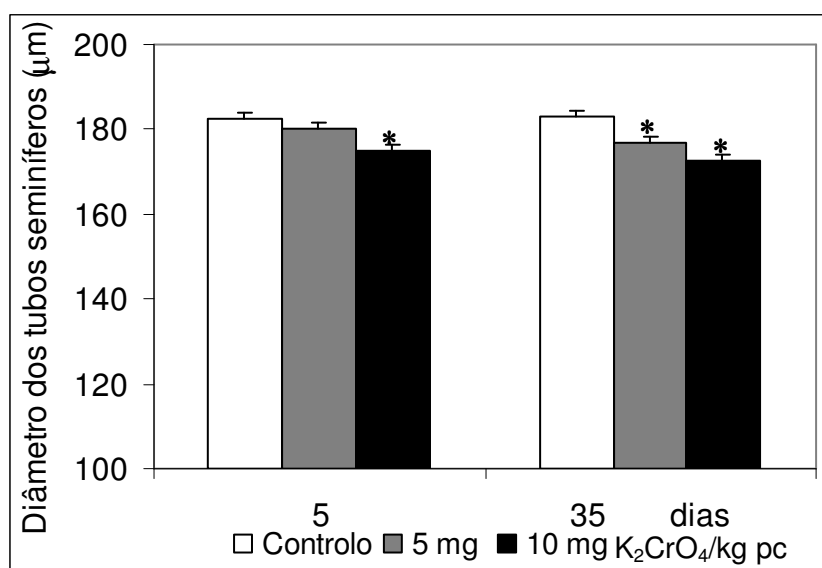


**Figura 48** Efeito do cromato de potássio na histologia do epidídimo ao fim de 5 dias (A) controlo, (B) 10 mg K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc e ao fim de 35 dias (C) controlo, (D) 10 mg K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc. H&E. A barra representa 40 μm.

#### 3.5.3.1 Estudo morfométrico dos tubos seminíferos

O diâmetro dos tubos seminíferos foi significativamente afectado pela administração de cromato de potássio, cinco dias após início da exposição, em particular na dose mais elevada ( $p < 0,001$ ). Após 35 dias, a redução do diâmetro foi significativa para ambas as doses de cromato de potássio testadas ( $p < 0,001$ ) (Figura 49).





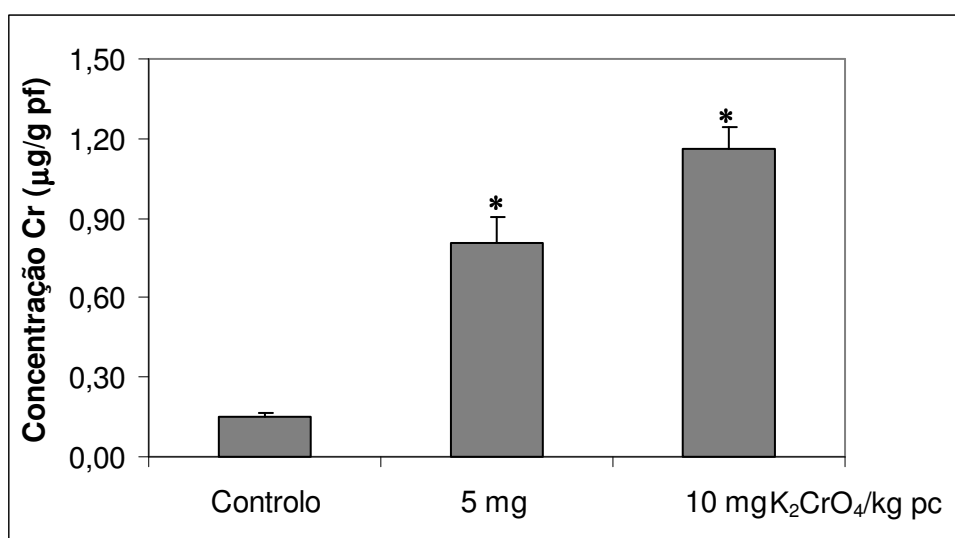
**Figura 49** Diâmetro dos tubos seminíferos de ratinhos controlo e administrados com cromato de potássio e sacrificados 5 dias ou 35 dias após o início da exposição. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,001$ .

#### 3.5.4 Quantificação dos níveis de crómio no testículo

Neste ensaio observou-se uma maior acumulação de crómio no testículo dos ratinhos administrados com cromato de potássio ( $p < 0,001$ ). A acumulação de crómio neste órgão aumentou linearmente com a dose de cromato de potássio administrada ( $y = 0,5079x - 0,3104$ ;  $r^2 = 0,9719$ ) (Figura 50). Para a dose de 5 mg de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc, a concentração de crómio no testículo aumentou 5,5 vezes, enquanto que para a dose de 10 mg de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>/kg pc o aumento foi de 7,9 vezes.

#### 3.5.5 Análise do conteúdo em DNA das células do testículo

A administração de 5 e 10 mg de cromato de potássio durante quatro dias consecutivos não induziu variações nas subpopulações de células germinativas, ao quinto dia ou passados 35 dias (Figura 51).



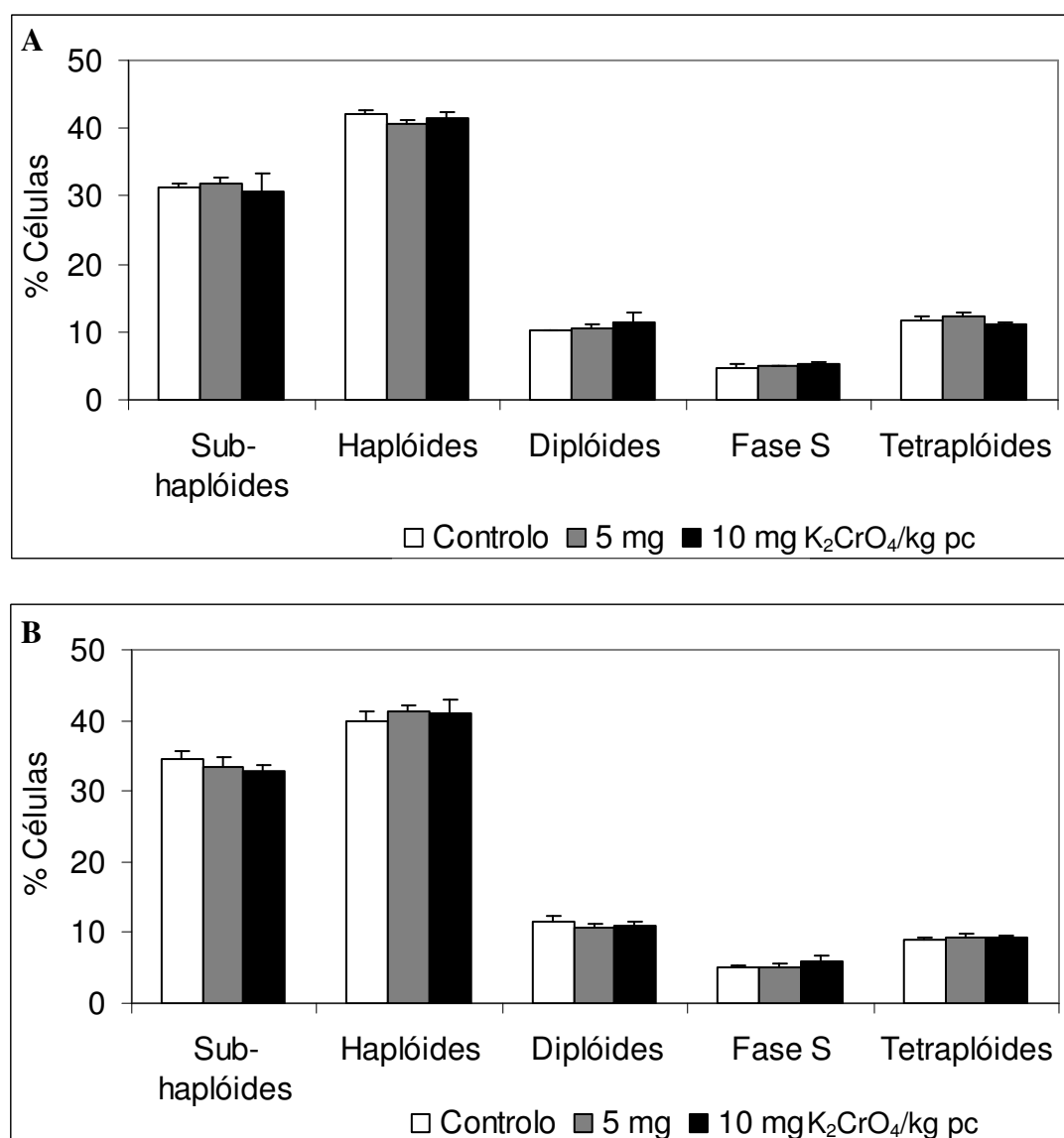
**Figura 50** Concentração dos níveis de crómio nos testículos dos ratinhos controlo e administrados com cromato de potássio e sacrificados 5 dias após o início da exposição. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,001$ .

### 3.5.6 Análise dos efeitos na função espermática

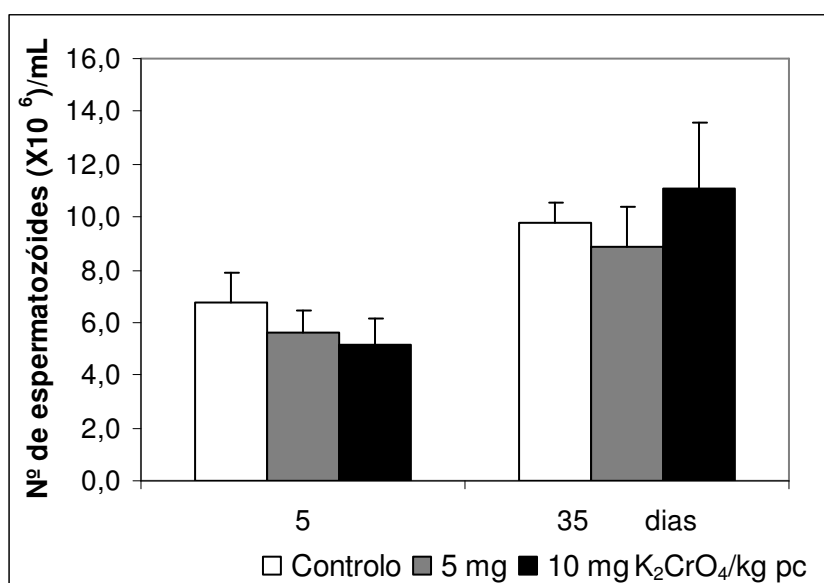
Com o objectivo de avaliar os efeitos do cromato de potássio nos espermatozóides de ratinho foram avaliados vários parâmetros genéticos e funcionais.

#### 3.5.6.1 Densidade

A densidade de espermatozóides não foi afectada significativamente pela exposição às concentrações de cromato de potássio testadas, quer imediatamente após a exposição, quer após 35 dias ( $p > 0,05$ ) (Figura 52).



**Figura 51** Percentagens de células germinativas isoladas de testículos de ratinhos controle e administrados com cromato de potássio e sacrificados ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 52** Efeito do cromato de potássio na densidade de espermatozóides ao fim de 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

### 3.5.6.2 Morfologia

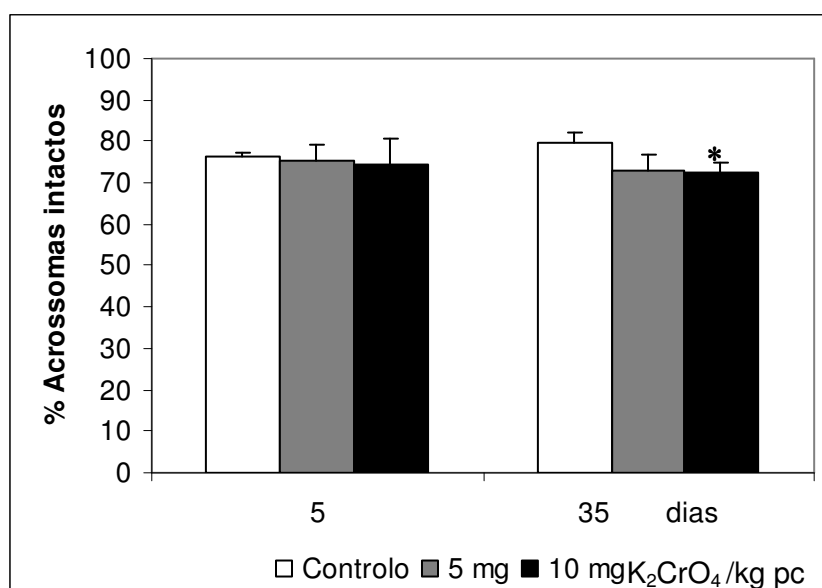
Observou-se um aumento da percentagem de células com múltiplas anomalias nos ratinhos administrados com 5 e 10 mg de  $K_2CrO_4/kg$  pc e sacrificados ao quinto dia da experiência ( $p < 0,05$ ). Ao fim de 35 dias detectou-se uma diminuição da percentagem de espermatozóides com morfologia normal na dose mais elevada de cromato de potássio ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15** Efeito do cromato de potássio na morfologia dos espermatozóides após 5 e 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

		Controlo	5 mg K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> /kg pc	10 mg K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> /kg pc
5 dias	Morfologia Normal (%)	71,4 $\pm$ 1,1	65,9 $\pm$ 2,4	65,8 $\pm$ 4,7
	Anomalias cabeça (%)	7,7 $\pm$ 1,6	9,2 $\pm$ 2,7	12,5 $\pm$ 3,8
	Anomalias cauda (%)	19,9 $\pm$ 1,0	23,6 $\pm$ 3,7	18,4 $\pm$ 1,4
	Anomalias peça intermediária (%)	0,7 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
	Anomalias múltiplas (%)	0,3 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,4*
35 dias	Morfologia Normal (%)	77,9 $\pm$ 2,0	73,6 $\pm$ 1,0	71,1 $\pm$ 1,5*
	Anomalias cabeça (%)	8,3 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,5	10,1 $\pm$ 1,6
	Anomalias cauda (%)	12,8 $\pm$ 1,7	13,2 $\pm$ 1,7	17,4 $\pm$ 2,2
	Anomalias peça intermediária (%)	0,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2
	Anomalias múltiplas (%)	0,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1

### 3.5.6.3 Integridade do acrossoma

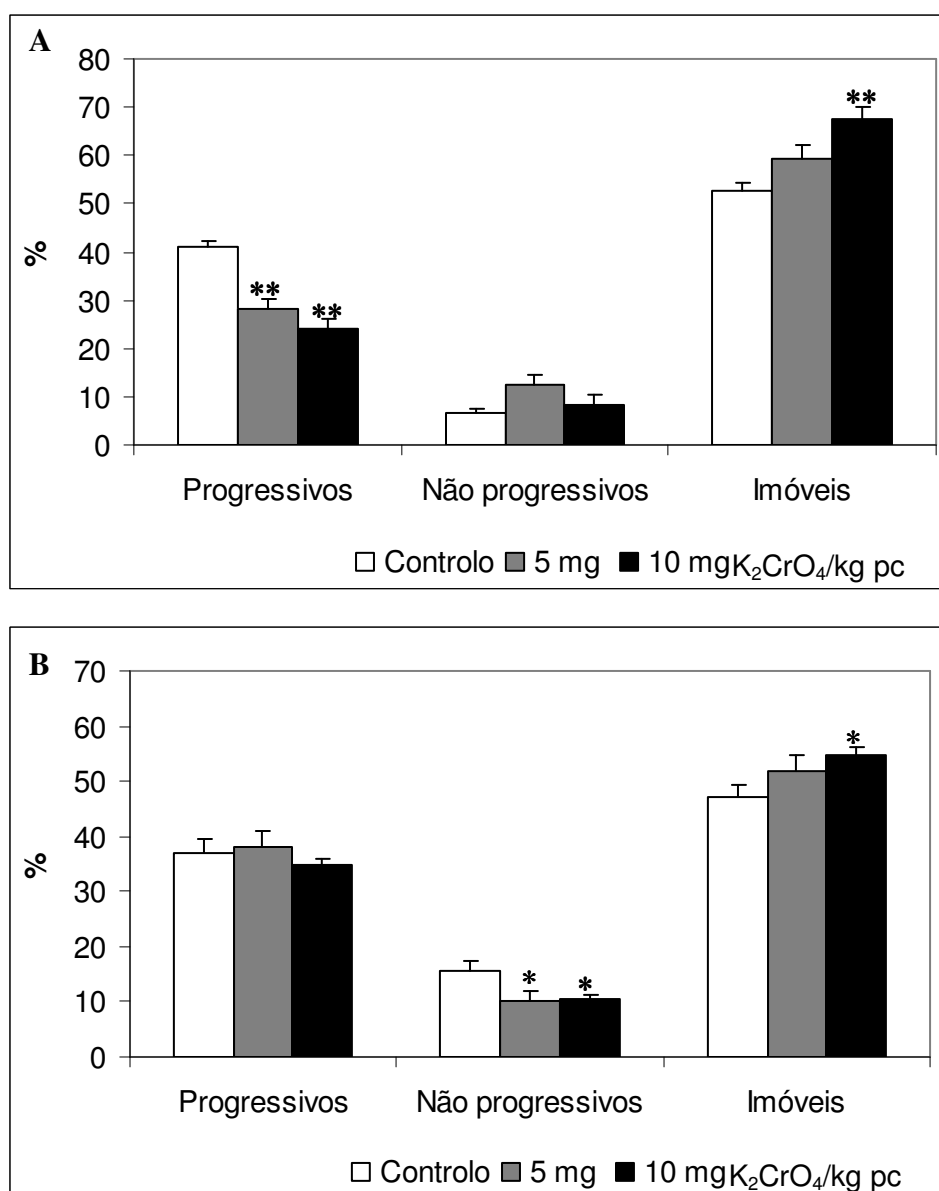
A avaliação da integridade do acrossoma mostrou uma redução da percentagem de espermatozóides com acrossomas intactos nos ratinhos administrados com 10 mg de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> ao fim de 35 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 53).



**Figura 53** Efeito do cromato de potássio na integridade do acrossoma. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

#### 3.5.6.4 Motilidade

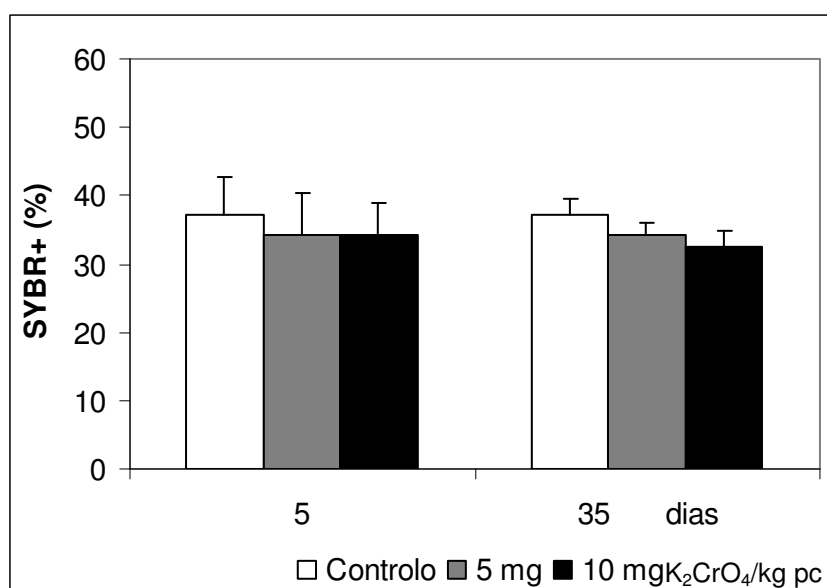
Relativamente à motilidade dos espermatozóides, verificou-se uma diminuição significativa da percentagem de células com movimento progressivo nos ratinhos injectados com 5 e 10 mg de  $K_2CrO_4$ /kg de pc. Ao fim de 35 dias observou-se um aumento significativo da percentagem de espermatozóides imóveis nos animais injectados com 10 mg de  $K_2CrO_4$ /kg pc (Figura 54).



**Figura 54** Efeito do cromato de potássio na motilidade dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão. O símbolo \* indica diferença significativa relativamente às amostras controlo para  $p < 0,05$ .

### 3.5.6.5 Viabilidade

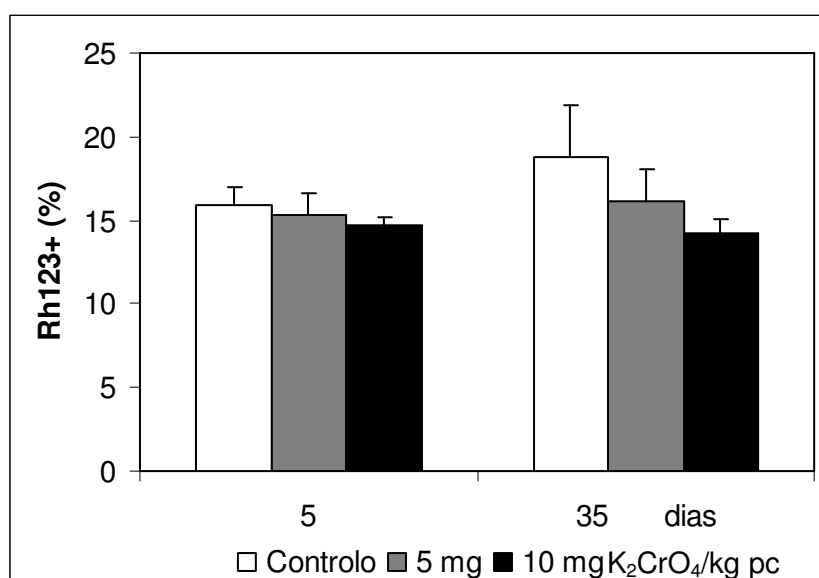
A viabilidade espermática, avaliada pela marcação fluorescente com SYBR-14 e PI por citometria de fluxo, não foi significativamente afectada pelas doses de cromato de potássio em nenhum dos períodos de avaliação ( $p > 0,05$ ) (Figura 55).



**Figura 55** Efeito do cromato de potássio na viabilidade dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

#### 3.5.6.6 Função mitocondrial

Tal como a viabilidade, a função mitocondrial também não foi significativamente afectada pela exposição ao cromato de potássio ( $p > 0,05$ ) (Figura 56).

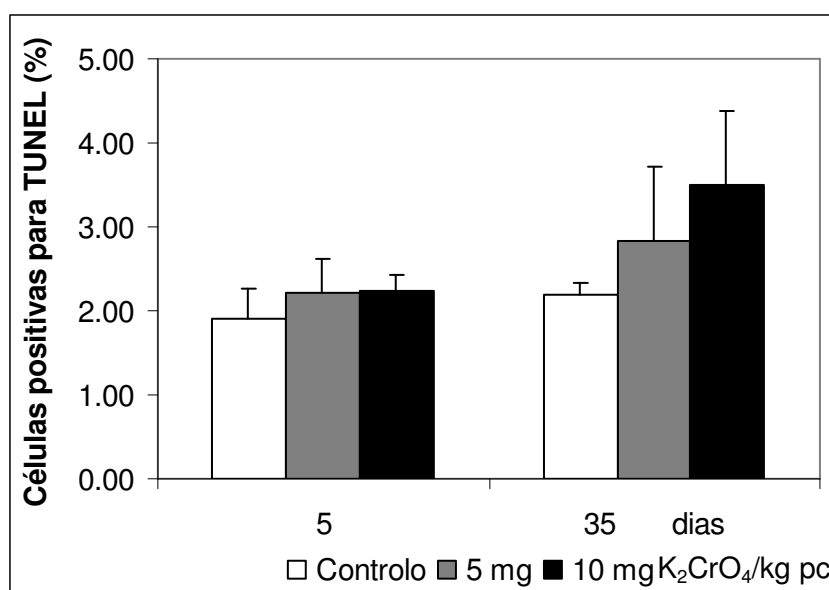


**Figura 56** Efeito do cromato de potássio na função mitocondrial dos espermatozóides ao fim de 5 (A) e 35 dias (B). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.



### 3.5.6.7 TUNEL

Nos espermatozóides dos ratinhos injectados com cromato de potássio, a marcação TUNEL mostrou uma tendência para um aumento da percentagem de células com quebras na cadeia de DNA. Contudo, este aumento não foi estatisticamente significativo ( $p>0,05$ ) (Figura 57).



**Figura 57** Efeito do cromato de potássio na percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio TUNEL ao fim de 5 e de 35 dias. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

### 3.5.6.8 SCSA

No que diz respeito à susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida, avaliada pelo SCSA, pode-se constatar pela análise da Tabela 16, que a administração de cromato de potássio não induziu alterações significativas em nenhum dos parâmetros do SCSA (%DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS) ( $p>0,05$ ).

**Tabela 16** Efeitos do cromato de potássio na susceptibilidade da cromatina dos espermatozóides à desnaturação ácida avaliada pelo ensaio SCSA ao fim de 5 e de 35 dias. %DFI, DFI-Médio, SD-DFI, %HDS: parâmetros do ensaio SCSA. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão.

	mg K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub> / kg pc	%DFI	DFI-Médio	SD DFI	%HDS
5 dias	Controlo	2,21 $\pm$ 0,27	0,24 $\pm$ 0,003	8,77 $\pm$ 0,69	3,27 $\pm$ 0,49
	5 mg	2,26 $\pm$ 0,39	0,23 $\pm$ 0,002	8,26 $\pm$ 0,92	3,75 $\pm$ 0,42
	10 mg	2,82 $\pm$ 0,48	0,24 $\pm$ 0,002	8,83 $\pm$ 0,88	3,93 $\pm$ 0,54
35 dias	Controlo	1,65 $\pm$ 0,25	0,23 $\pm$ 0,005	6,75 $\pm$ 0,34	3,03 $\pm$ 0,18
	5 mg	2,15 $\pm$ 0,22	0,24 $\pm$ 0,002	6,84 $\pm$ 0,72	3,23 $\pm$ 0,17
	10 mg	1,92 $\pm$ 0,31	0,23 $\pm$ 0,004	6,87 $\pm$ 0,48	3,51 $\pm$ 0,33

## **4. DISCUSSÃO**

## 4.1 Estudos morfométricos do testículo

O método tradicional de medição do diâmetro dos tubos seminíferos baseia-se na medição do seu menor diâmetro ao microscópio óptico. Contudo, é bastante difícil, ou mesmo impossível para o olho humano, distinguir com rigor qual o menor eixo dos tubos seminíferos. Tradicionalmente, esta medição é feita com base em aproximações, que podem originar uma menor precisão, o que em ensaios toxicológicos é problemático, pois pode dificultar a comparação entre diferentes tratamentos.

Apesar de existirem programas informáticos que podem ser aplicados na medição dos tubos seminíferos como o Visilog 5® (Alonso et al, 2007) ou o Scion Image Software (Bustos-Obregon, 2003; Cho et al, 2003), a medição manual continua a ser utilizada actualmente (Guneli et al, 2007; Sudwan et al, 2007; Cardone et al, 2008).

O novo programa de medição Snakes aplicado no presente trabalho, baseado em modelos deformáveis, além de permitir uma medição rigorosa do diâmetro dos tubos seminíferos pelo seu menor eixo, fornece ainda outros dados, nomeadamente o diâmetro pelo maior eixo e área dos tubos. Deste modo, é possível determinar quais os tubos seminíferos que foram medidos e quais as características de cada um. Contrariamente ao método tradicional, no qual não é possível marcar os tubos seminíferos, podendo eventualmente o mesmo tubo ser medido várias vezes.

O programa de medição utilizado no presente trabalho (Snakes) apresenta a vantagem de ter sido desenvolvido especificamente para analisar imagens de testículo, tendo sido optimizado de forma a ultrapassar alguma especificidades inerentes ao tipo de tecido, nomeadamente baixa definição dos limites dos tubos seminíferos, ou baixo contraste em algumas imagens. Este programa, embora actualmente ainda não esteja disponível ao público em geral, a breve trecho será disponibilizado.

## **4.2 Selecção do protocolo mais adequado para o isolamento de células do testículo**

O desenvolvimento de protocolos de isolamento de núcleos a partir de amostras fixadas pode potenciar a utilização da citometria de fluxo em estudos de toxicidade do sistema reprodutor. A solução de Bouin é um fixador rotineiramente utilizado na fixação do testículo para avaliação histológica da espermatogénese (Szczzech e Russel, 1997) e, como tal, a sua eficácia foi avaliada na fixação de núcleos para análise por citometria de fluxo. Contudo, este fixador não produziu resultados satisfatórios em termos da avaliação do conteúdo em DNA, tal como já tinha sido anteriormente descrito por Hedley (1989) em amostras de tecido tumoral. Uma vez que utilizando o formol tamponado a 10% como fixador se obtiveram bons resultados em termos de avaliação do conteúdo em DNA por citometria de fluxo, utilizou-se este fixador nestes estudos e a solução de Bouin foi usada apenas para os estudos histopatológicos.

Os diferentes métodos utilizados para o isolamento de células do testículo de ratinhos a partir de amostras a fresco, originaram resultados claramente diferentes. O Protocolo F1, apesar de ter sido utilizado com sucesso no hamster dourado (Golan et al, 2000), não permitiu uma clara definição dos picos, possivelmente devido a especificidades de cada espécie no isolamento das células testiculares. O Protocolo F3 foi já anteriormente utilizado para o isolamento de células animais (Otto, 1992). Este protocolo, quando aplicado ao isolamento de células de testículo, forneceu uma boa definição dos picos (os valores de CV obtidos foram dos mais baixos), assim como um nível muito baixo de lixo ("debris"). Contudo, com a aplicação deste protocolo ocorreu a formação de um grande número de dupletos. Além disso, a subpopulação de espermátides alongados foi subestimada, provavelmente devido à elevada força iónica dos tampões utilizados neste protocolo (Otto, 1992). Finalmente, com o Protocolo F2, foi obtida uma boa definição dos picos e as percentagens de células nos diferentes níveis de ploidia são consistentes com os resultados

previamente obtidos por outros autores (Jagetia et al, 1996; Spanò et al, 1996). Por outro lado, apesar de o Protocolo F3 apresentar picos discretos, os CV obtidos não mostram grande melhoria relativamente aos obtidos pelo Protocolo F2. Uma vez que o Protocolo F3 é mais longo e mais agressivo para as amostras do que o Protocolo F2, optou-se por seleccionar este último. Com os dois protocolos de isolamento de núcleos a partir de amostras parafinadas obtiveram-se resultados semelhantes. Contudo, o Protocolo P2 apresentou-se mais reprodutível em termos de número de núcleos/segundo (dados não apresentados), provavelmente devido ao menor número de procedimentos deste protocolo. Assim, o Protocolo P2 foi seleccionado para a avaliação dos efeitos dos três compostos metálicos usados no presente trabalho no testículo dos ratinhos.

### **4.3 Efeitos do cloreto de chumbo na fertilidade do ratinho**

Os dados disponíveis na literatura referentes aos efeitos do chumbo na espermatogénese do ratinho são escassos e, em parte, contraditórios (Tabela 1). Este facto pode ser devido a vários factores, nomeadamente, a estirpe, o composto de chumbo, o esquema de administração, a dose, a duração da exposição ou a idade dos animais, tal como descrito por Apostoli e colaboradores (1998). No que diz respeito aos efeitos do chumbo na espermatogénese e na função espermática de roedores, pode constatar-se na literatura (Tabela 1) uma grande variedade de protocolos de administração usados, incluindo períodos de exposição e vias de administração. No entanto, o cloreto de chumbo tem sido o composto menos estudado.

O peso corporal, assim como o do testículo e do epidídimo não foram afectados pela exposição ao cloreto de chumbo, embora se possa constatar pela observação da Tabela 1 que por vezes estes parâmetros são afectados. Alguns dos estudos efectuados em várias espécies de roedores não demonstraram efeitos no testículo (Pinon-Lataillade et al, 1993; Adhikari et al,

2001). Outros porém, referem lesões histopatológicas no testículo devido à acção do chumbo (Batra et al, 2001).

No presente trabalho, e com excepção de uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos ao fim de 35 dias, a exposição ao cloreto de chumbo não induziu alterações na histologia quer do testículo, quer do epidídimo. Da mesma forma, o chumbo também não induziu alterações significativas nas percentagens relativas de células germinativas avaliadas por citometria de fluxo, com excepção de um aumento na percentagem de células em fase S. Este aumento pode estar relacionado com alguma actividade mitogénica do chumbo, já anteriormente relatada em linfócitos (Razani-Boroujerdi et al, 1999) e células de fígado (Bell et al, 1993). Estes resultados sugerem que a BHT proteja o epitélio seminífero da acção tóxica do chumbo. A ausência de danos na BHT devido ao chumbo foi já descrita por outros autores (eg Murthy et al, 1995).

Relativamente à acumulação de chumbo no testículo, observou-se um aumento significativo, logo 5 dias após o início da exposição, o que está de acordo com outros estudos anteriormente efectuados, nomeadamente em ratos expostos a 5, 10 e 20 mg de acetato de chumbo/kg pc (Adhikari et al, 2001).

No presente trabalho, a densidade espermática não foi afectada pela exposição ao cloreto de chumbo após um ciclo espermatogénico, o que indica que os potenciais efeitos deste metal apenas se manifestam em concentrações de chumbo mais elevadas, ou em exposições mais prolongadas. Outros autores também não detectaram alterações na densidade espermática (Tabela 1) em ratos (Pinon-Lataillade et al, 1993; Murthy et al, 1995) e ratinhos (Pinon-Lataillade et al, 1995) em exposições subcrónicas a chumbo.

A motilidade espermática foi afectada pela exposição ao chumbo em ambos os períodos experimentais, indicando o seu possível efeito directo nos espermatozóides, ao fim de 5 dias e um potencial efeito indirecto após 35 dias. Contudo, outros parâmetros como a viabilidade e a função mitocondrial não foram significativamente afectados. Alterações na

motilidade espermática devido à acção do chumbo foram já descritas em várias espécies, incluindo o ratinho (Wadi e Ahmad, 1999), o rato (Hsu et al, 1997) e o coelho (Moorman et al, 1998). O aumento da percentagem de espermatozóides imóveis devido à exposição ao chumbo não foi acompanhado por alterações na função mitocondrial e na viabilidade. Neste contexto, pode-se inferir que o chumbo afecta a motilidade antes de afectar a função mitocondrial ou a viabilidade dos espermatozóides (embora ambas possam conduzir a alterações na motilidade).

A redução da motilidade dos espermatozóides pode também ser originada pelos efeitos indirectos do chumbo nos espermatozóides, tais como a geração de espécies reactivas de oxigénio. A formação destas espécies pode originar peroxidação lipídica, em particular dos lípidos das membranas plasmáticas e que lhes conferem a fluidez necessária para a motilidade, integridade estrutural e por fim a viabilidade dos espermatozóides (Aitken et al, 1989; Baumber et al, 2000; Wathes et al, 2007). Um outro mecanismo pelo qual a produção de espécies reactivas de oxigénio pode influenciar a motilidade dos espermatozóides, é pela redução da fosforilação das proteínas do axonema, necessárias para o movimento dos espermatozóides (de Lamirande e Gagnon 1992). Uma terceira hipótese pode envolver a redução dos níveis de ATP devido a espécies reactivas de oxigénio, originando uma redução da motilidade dos espermatozóides sem redução do potencial de membrana mitocondrial (Armstrong et al, 1999). Além disso, Baumber e colaboradores (2000) detectaram uma redução da motilidade dos espermatozóides na presença de espécies reactivas de oxigénio, mais uma vez, sem uma correspondente redução da viabilidade ou da função mitocondrial. Por outro lado, os efeitos directos do chumbo na motilidade dos espermatozóides devem também ser considerados. Estudos anteriores demonstraram que os metais inibem o "sliding" dos microtúbulos (eg Kanous et al, 1993). Além disso, o chumbo pode também interferir com a ligação do cálcio à calmodulina, tal como descrito anteriormente para o cádmio (Lindemann et al 1991) e, assim, afectar a fosforilação de alguns componentes dos espermatozóides e consequentemente reduzir a



motilidade dos mesmos, sem, contudo, afectar a sua viabilidade (Zeng e Tulsiani, 2003).

Um dos efeitos do chumbo mais frequentemente demonstrado nos espermatozóides consiste num aumento da percentagem de formas anormais (Apostoli et al, 1998; Wadi e Ahmad, 1999; Acharya et al, 2003). Neste contexto, no presente estudo foi observada uma diminuição significativa da percentagem de espermatozóides normais nos ratinhos injectados com 100 mg  $PbCl_2$ /kg pc, 5 dias após o início da exposição, estando assim este resultado de acordo com outros trabalhos descritos na literatura (Tabela 1).

No presente trabalho, observou-se uma diminuição da percentagem de espermatozóides com acrossoma intacto, ou seja, uma maior percentagem de células com reacção acrossómica prematura induzida pela exposição ao chumbo. Este efeito foi já observado em ratinhos (Johanson, 1989) e em ratos Sprague-Dawley (Hsu et al, 1998). No entanto, um outro estudo, porém, refere um aumento da integridade acrossómica após a administração de 74 mg  $PbCl_2$ /kg pc (Graça et al, 2004). Esta diferença pode ser devida a uma menor quantidade absoluta de chumbo administrada. Concentrações elevadas de chumbo no líquido seminal em humanos foram já correlacionadas com reacção acrossómica prematura e diminuição das taxas de fertilização (Benoff et al, 2003).

No período de 5 dias após o início da exposição, verificou-se uma correlação negativa entre a percentagem de células positivas para TUNEL e a de células com morfologia normal ( $r=-0,995$ ;  $p=0,0272$ ). Outros autores também verificaram a correlação entre o aumento das anomalias morfológicas e o aumento da fragmentação do DNA em espermatozóides humanos (Muratori et al, 2000). Neste período (5 dias) observou-se também uma correlação negativa entre a dose de chumbo administrada e a integridade do acrossoma ( $r=-0,999$ ;  $p=0,0253$ ), o que significa que a perda de integridade acrossómica é inversamente proporcional à dose de chumbo. No primeiro período de sacrifício observou-se ainda uma correlação positiva entre a função mitocondrial e a vitalidade ( $r=0,999$ ;  $p=0,0214$ ), o que indica,

como seria esperado, que os espermatozóides vivos apresentam maior actividade mitocondrial.

No período dos 35 dias desde o início da exposição ao chumbo, a densidade celular correlacionou-se negativamente com a percentagem de células positivas para TUNEL ( $r=-1,0$ ;  $p=0,00698$ ). Uma correlação negativa foi também detectada entre a viabilidade espermática e a dose de chumbo ( $r=-0,997$ ;  $p=0,048$ ), o que significa que à medida que a concentração de chumbo aumenta, a viabilidade espermática diminui. Neste período, observou-se também uma correlação positiva entre a integridade acrossómica e a morfologia normal ( $r=0,997$ ;  $p=0,046$ ), ou seja, à medida que a integridade acrossómica diminui, reduz-se também a percentagem de espermatozóides com morfologia normal.

O cloreto de chumbo, nas doses administradas, não induziu alterações na fragmentação do DNA, ou na susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida. O DNA do espermatozóide é por natureza normalmente resistente a agressões, devido à sua estrutura fortemente compactada. Durante a maturação dos espermatozóides no epidídimo, a estabilidade da cromatina aumenta através da formação de ligações disulfito entre os resíduos tiol da cisteína das protaminas, dando origem a um núcleo mais rígido e compacto, que é concomitante com uma redução nas dimensões da célula (Johansson e Pellicciari, 1988). A manutenção da estabilidade da cromatina condensada é assegurada pelo zinco através da ligação aos resíduos de cisteína das protaminas (Quintanilla-Veja et al, 2000). Uma vez que o chumbo apresenta elevada afinidade pela P2, uma ligação do chumbo a esta protamina pode originar uma diminuição da interacção P2-DNA, interferindo assim na condensação e estabilidade da cromatina.

Em conclusão, a exposição a 74 e 100 mg de cloreto de chumbo/kg pc durante quatro dias induziu um aumento da acumulação de chumbo no testículo dos ratinhos. Estas concentrações originaram uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos nos ratinhos sacrificados após 35 dias, contudo, não induziram outras alterações histológicas, quer no testículo, quer no epidídimo. Simultaneamente, a análise das subpopulações de células do

testículo por citometria de fluxo revelou um aumento da percentagem de células em fase S nos ratinhos sacrificados ao quinto dia da experiência. A análise dos espermatozóides, por sua vez, revelou alterações ao nível funcional, nomeadamente da sua motilidade, morfologia e integridade do acrossoma. Por outro lado, a exposição a estas doses de cloreto de chumbo não induziu fragmentação do DNA nos espermatozóides, nem alterou a estrutura da sua cromatina.

#### **4.4 Efeitos do cloreto de cádmio na fertilidade do ratinho**

Os efeitos do cádmio na fertilidade masculina têm sido objecto de estudo desde há várias décadas (Parizek e Zahor, 1956; Gunn et al, 1965; Aoki e Hoffer, 1978; Hew et al, 1993; Zhou et al, 2004). Estudos em roedores demonstraram que o testículo é mais sensível à toxicidade do cádmio do que outros órgãos e que doses baixas de composto não produzem efeitos no estado geral dos indivíduos, mas interferem com a sua função testicular (Gunn et al, 1965; Aoki e Hoffer, 1978; Hew et al, 1993; Swiergosz-Kowalewska, 2001) (Tabela 2).

Neste trabalho, estudaram-se os efeitos da administração de 1, 2 e 3 mg de cloreto de cádmio/kg pc no testículo e epidídimo e em alguns parâmetros funcionais dos espermatozóides de ratinhos. A avaliação foi feita 24 horas e 35 dias após a administração do composto.

O exame histológico mostrou que 24 horas após a administração, o cloreto de cádmio lesou severamente o testículo, sendo visível a presença de hemorragia, edema intersticial, ruptura do epitélio germinativo e redução do diâmetro dos tubos seminíferos. A administração de cloreto de cádmio induziu também um aumento significativo do peso relativo e absoluto do testículo, 24 horas após a administração do composto. Um efeito semelhante foi igualmente observado por Shen e Sangiah (1995) em ratinhos CD1 injectados subcutaneamente com 1 mg de  $\text{CdCl}_2$ /kg pc. O aumento de peso do testículo foi causado pelas lesões induzidas pelo cádmio nas células endoteliais dos capilares e, consequente, aumento da permeabilidade

vascular que originou a formação de edema intersticial. Por outro lado, o cádmio ao afectar a BHT altera a adesão quer entre células adjacentes, quer entre as células de Sertoli e as células germinativas (Wong et al, 2004). Como consequência, ocorre desorganização do epitélio seminífero, podendo também ocorrer esfoliação de células germinativas, em particular dos espermatídeos (uma vez que são as células mais próximas do lúmen dos tubos seminíferos). Esta hipótese é apoiada pela observação de células imaturas no lúmen do epidídimo, e pode explicar também o decréscimo da percentagem de espermatídeos redondos e alongados observado por citometria de fluxo.

O aumento da permeabilidade vascular e consequente anoxia do testículo pode ter como resultado a degenerescência e morte de células germinativas (Aoki e Hoffer, 1978). Além disso, estudos anteriores haviam já demonstrado a irreversibilidade das lesões na BHT (Wong et al, 2004). Como consequência destes factos, 35 dias após a exposição ao cloreto de cádmio observou-se necrose testicular severa com degenerescência dos tubos seminíferos e ausência de células germinativas. A necrose testicular ocorreu devido à isquémica do testículo, causada pelo aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, aumento da pressão intratesticular e diminuição do fluxo sanguíneo para o testículo (Schlaepfer, 1971). As lesões necróticas e degenerativas induzidas pelo cloreto de cádmio no testículo explicam também a diminuição de peso neste órgão 35 dias após a administração do composto (Nordberg, 1971).

Zhou e colaboradores (2004) testaram uma dose baixa de cloreto de cádmio ( $\cong 0,926$  mg/kg pc). Estes autores não observaram alterações histológicas no testículo, embora tivessem descrito inibição da expressão de vários genes relacionados com a reparação do DNA. No presente trabalho, observou-se que a dose de 1 mg de  $\text{CdCl}_2$ /kg pc (que também não induziu alterações histológicas no testículo) alterou o mecanismo de reparação de erros de emparelhamento, tendo induzido IMS. Embora os marcadores testados tenham apresentado diferentes sensibilidades, dois deles (Mus 1 e Mus 5) permitiram identificar a presença de IMS. No entanto, foi o Mus 1 que

apresentou maior sensibilidade, tendo detectado IMS em quatro amostras. No geral, quatro das amostras de ratinhos tratados com 1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc foram classificadas como apresentando elevado IMS, uma vez que evidenciaram alterações em dois dos marcadores testados. Nas restantes, considerou-se existir estabilidade de microssatélites. A presença deste fenótipo mutante nas amostras de testículo dos ratinhos expostos a cloreto de cádmio pode ser indicador do desenvolvimento de tumores (Kabbarah et al, 2003).

O cádmio teve uma rápida acumulação no testículo, tendo sido encontrado em valores 300 vezes superiores aos do controlo nos ratinhos injectados com 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. Neste trabalho foi também encontrada uma correlação positiva entre os níveis de cádmio no testículo e a dose de cloreto de cádmio administrada ( $r=0,954$ ;  $p=0,0459$ ). Zhou e colaboradores (2004) também constataram a rápida acumulação de cádmio no testículo logo 12 horas após a administração, atingindo o seu máximo de acumulação após 24 horas. Experiências em ratos injectados subcutaneamente com 0,6 mg Cd/kg pc demonstraram que este metal se acumula no testículo, em particular nas espermatogónias e nos espermátócitos (Aoyagi et al, 2002), contrariamente ao verificado por Bench e colaboradores 1999). Estes investigadores que não detectaram a presença de cádmio nos espermatozóides nem nos espermátídeos de ratinhos injectados com 6,75 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc, nem em ratinhos injectados com 0,1 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc uma vez por semana durante 4, 10, 26 ou 52 semanas.

Nos animais sacrificados 24 horas após a administração do cloreto de cádmio não se observaram diferenças significativas na concentração de espermatozóides, contrariamente ao verificado nos ratinhos sacrificados 35 dias após a administração deste composto, em que a concentração de espermatozóides nos animais tratados com 3 mg de CdCl<sub>2</sub>/kg pc sofreu uma redução de 99% relativamente as animais controlo. Esta redução da concentração de espermatozóides após 35 dias é explicada pela necrose testicular que danificou irreversivelmente a espermatogénese (Nordberg, 1971).

A diminuição significativa da percentagem de espermatozóides com morfologia normal, 24 horas após a administração de 2 e 3 mg de cloreto de cádmio/kg pc é devida sobretudo ao aumento significativo da percentagem de células com anomalias na cabeça. Após 35 dias esta redução é devida sobretudo a uma maior incidência de anomalias na cabeça e na cauda. Estudos em humanos referem a correlação entre a concentração de cádmio no sangue e anomalias na morfologia dos espermatozóides (Telisman et al, 2000). Em ratinhos injectados com 1 mg de  $\text{CdCl}_2$ /kg pc também se observou o aumento da percentagem de espermatozóides com morfologia anormal (Acharya et al, 2008). A percentagem de células com anomalias na cabeça correlacionou-se negativamente com a percentagem de células com acrossoma intacto 24 horas e 35 dias após a administração do cloreto de cádmio ( $r=-0,983$ ;  $p=0,0171$  e  $r=-0,962$ ;  $p=0,0380$ , respectivamente)

A competição do cádmio com o cálcio intracelular pelos locais de ligação ao cálcio pode originar a exocitose prematura do acrossoma verificada nos ratinhos expostos a 2 e 3 mg de  $\text{CdCl}_2$ /kg pc. Este efeito foi já anteriormente observado por Leoni e colaboradores (2002) em espermatozóides de carneiro expostos *in vitro* a 2  $\mu\text{M}$  de cloreto de cádmio. Em humanos, a presença de varicocelo está normalmente associada a níveis mais elevados de cádmio no sémen comparativamente aos controlos férteis. Frequentemente, os espermatozóides destes pacientes apresentam também anomalias na reacção acrossómica (Benoff et al, 1997).

A exposição ao cloreto de cádmio, embora não tenha afectado significativamente a viabilidade dos espermatozóides após 24 horas, afectou significativamente a sua mobilidade e função mitocondrial. Este efeito foi ainda mais drástico nos animais sacrificados ao fim de 35 dias, sobretudo nos ratinhos administrados com 3 mg de  $\text{CdCl}_2$ /kg pc, nos quais a percentagem de espermatozóides imóveis foi superior a 90%. Estudos *in vitro* mostraram que o cádmio em doses 2 e 20  $\mu\text{M}$  afectou negativamente a viabilidade de espermatozóides de carneiro (Leoni et al, 2002). Xu e colaboradores (2001) sugerem ainda que a mobilidade seja um parâmetro sensível à toxicidade do cádmio. A redução da motilidade dos espermatozóides após exposição dos

ratinhos ao cloreto de cádmio pode ser explicada pelo efeito do cádmio nos microtúbulos. Estudos anteriores referem que o cádmio inibe o “sliding” dos microtúbulos em espermatozóides de bovinos (Kanous et al, 1993). Este fenómeno está na base do movimento ondulatório do flagelo. Além disso, estudos anteriores mostraram também que o cádmio inibe a associação de microtúbulos em cérebro de porco (Brunner et al, 1991) e touro (Wallin e Hartley-Asp, 1993). Por outro lado, neste trabalho a exposição ao cádmio também afectou a função mitocondrial dos espermatozóides. A microanálise de raios-X em células de fígado e de tiróide de ratos tratados com compostos de cádmio demonstrou que este elemento se acumula nas mitocôndrias (Kawahara et al, 1990; Yoshizuka et al, 1991). Au e colaboradores (2001) mostraram também a desorganização das cristas mitocondriais em espermatozóides de ouriço-do-mar após exposição directa ao cádmio. Além disso, foi já demonstrado em espermatozóides de rato que o cádmio compete com o cálcio pela ligação à calmodulina (Lindemann et al, 1991). Dado que esta ligação é importante para a motilidade dos espermatozóides, a inibição da calmodulina resulta na diminuição da motilidade em espermatozóides de ratinho (Schlingmann et al, 2007). Sabe-se também que o cádmio induz stress oxidativo devido à acumulação de espécies de oxigénio reactivas, nomeadamente o anião radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ) (Waisberg et al, 2003). Tal como escrito na secção 4.3, as espécies de oxigénio reactivas podem afectar a motilidade dos espermatozóides por várias formas: por peroxidação dos lípidos das membranas, diminuição da fosforilação das proteínas do axonema, ou redução dos níveis de ATP.

El-Demerdash e colaboradores (2004) também observaram alterações na densidade e função dos espermatozóides (motilidade, viabilidade e morfologia) de ratos expostos a 5 mg de  $CdCl_2/kg$  pc/dia durante 30 dias.

No presente trabalho, a administração de cloreto de cádmio não induziu variações na susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida após 24 horas. A estabilidade da cromatina condensada é assegurada pelo zinco através da ligação aos resíduos de cisteína das protaminas (Quintanilla-

Veja et al, 2000). Bench e colaboradores (1999) demonstraram que os níveis de zinco nos espermatozóides não são afectados pela exposição ao cádmio. Assim, aparentemente o zinco não é substituído pelo cádmio na cromatina o que explica a manutenção da sua estabilidade nos espermatozóides dos ratinhos expostos a cloreto de cádmio.

No presente trabalho, o cádmio não induziu fragmentação do DNA nos espermatozóides de ratinhos sacrificados 24 horas após a administração, contrariamente ao verificado nos ratinhos sacrificados após 35 dias, que apresentaram fragmentação nas doses de 2 e 3 mg CdCl<sub>2</sub>/kg pc. Sergerie e colaboradores (2000) descreveram níveis de cádmio no líquido seminal e no sangue de homens fumadores significativamente superiores aos não fumadores. No entanto, esse aumento não correspondeu a diferenças significativas nos níveis de fragmentação do DNA nos espermatozóides, contrariamente ao verificado por outros autores (Sun et al, 1997; Potts et al, 1999). Assim, em humanos não parece ser consensual a relação entre a presença de cádmio no líquido seminal e a fragmentação de DNA nos espermatozóides.

Em conclusão, a exposição a cloreto de cádmio originou um aumento muito acentuado da acumulação de cádmio no testículo. Induziu também alterações histopatológicas severas no testículo, nomeadamente a ruptura do epitélio germinal, com presença de edema, hemorragia e consequente alteração nos diâmetros dos tubos seminíferos 24 horas após a administração. Simultaneamente, no mesmo período, a administração do cloreto de cádmio induziu também alterações nas subpopulações de células do testículo, com diminuição da percentagem relativa de espermátides redondos e alongados, possivelmente devido à esfoliação de células do testículo em consequência dos efeitos do cádmio na BHT. Dada a irreversibilidade das referidas lesões, após um ciclo espermatogénico verificou-se a presença de necrose testicular. Por outro lado, a dose mais baixa de composto testada induziu IMS no testículo após 35 dias. A exposição dos ratinhos a cloreto de cádmio originou também alterações na função espermática, com redução da densidade, alterações na morfologia, motilidade e integridade do



acrossoma. Simultaneamente, verificaram-se efeitos genotóxicos do cloreto de cádmio nos espermatozóides, com aumento da percentagem de células com fragmentação do DNA nos animais sacrificados após 35 dias.

#### **4.5 Efeitos do cromato de potássio na fertilidade do ratinho**

O crómio é um metal a que o Homem está bastante exposto, dada a ubiquidade da sua presença no ambiente e ao nível ocupacional. Embora já existam alguns estudos que relacionam a exposição ao crómio com problemas de saúde, nomeadamente dermatites de contacto, perfuração do septo nasal e cancro do pulmão (Dayan e Paine, 2001), os dados existentes na literatura não permitem ainda relacionar indubitavelmente a exposição ao crómio com alterações na fertilidade. Os estudos em animais de laboratório são também ainda escassos (Tabela 3).

No presente estudo pretendeu-se analisar os efeitos imediatos da exposição ao crómio (5 dias) e após um ciclo espermatogénico (35 dias) no testículo e no epidídimo e em vários parâmetros funcionais dos espermatozóides de ratinho após um curto período de exposição diária (4 dias) a níveis não muito elevados de metal. Uma abordagem semelhante foi realizada por Ernst (1990) nos seus estudos experimentais com ratos expostos a crómio trivalente e hexavalente.

A histologia do testículo ou do epidídimo dos ratinhos não foi afectada pela exposição a 5 e 10 mg de cromato de potássio/kg pc durante 4 dias, nem após 5 dias, nem após 35 dias. Contudo, estudos anteriores referem alterações histológicas no testículo como resultado da exposição ao crómio. Ernst (1990) em ratos administrados com 1, 2 e 4 mg de Cr(VI)/kg pc durante 5 dias observou degenerescência do epitélio seminífero. Num outro estudo, Chandra e colaboradores (2007) detectaram alterações no epitélio seminífero e degenerescência das células de Leydig em ratos administrados com 0,6 mg de dicromato de potássio/kg pc durante 26 dias. Em ratos expostos a trióxido de crómio, Li e colaboradores (2001) observaram alterações na disposição das células no epitélio seminífero. Em ratinhos

expostos a crómio(V) na forma de  $[\text{CrV-BT}]^{2-}$  observaram-se alterações na permeabilidade da BHT (Pereira et al, 2002), bem como alterações na histoarquitECTURA do testículo, com desorganização e degenerescência do epitélio seminífero, necrose e vacuolização de células germinativas e de células do epitélio do epidídimo (Pereira et al, 2004; 2005). À semelhança da ausência de alterações na histologia do testículo após a administração de 5 e 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$  durante 4 dias, também não se observaram alterações significativas nas percentagens relativas das células do testículo, avaliadas por citometria de fluxo.

Neste trabalho, observou-se uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos para a dose de 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$  após 5 dias e para as doses de 5 e 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$  após 35 dias. A redução do diâmetro dos tubos seminíferos parece ser uma resposta frequente à toxicidade do Cr(VI), tendo sido detectada em macacos (Arulldhas et al, 2005) e ratos (Chandra et al, 2007) expostos a dicromato de potássio e em ratos expostos a trióxido de crómio (Li et al, 2001).

Os ratinhos administrados com 5 e 10 mg de  $\text{K}_2\text{CrO}_4/\text{kg pc}$  apresentaram uma acumulação de crómio no testículo significativamente superior à dos ratinhos controlo, com um aumento próximo de 8 vezes para a dose mais elevada. Murthy e colaboradores (1991) encontraram igualmente maior acumulação de crómio no testículo em ratos administrados com 2 mg de dicromato de potássio durante 15 dias.

A concentração de espermatozóides não foi afectada pela exposição ao crómio, em nenhum dos períodos experimentais testados no presente trabalho. No primeiro período (5 dia), este efeito poderia ser expectável devido ao curto período desde o início da exposição até ao sacrifício e que poderá não ser suficiente para induzir alterações na concentração espermática. No segundo período de sacrifício (35 dias), poderiam ser esperadas alterações na concentração espermática, dado que estudos anteriores relacionaram a redução da produção espermática com a exposição ao crómio (Li et al, 2001; Acharya et al, 2004; 2006). No

entanto, neste período também não se verificaram alterações significativas na concentração espermática.

No que diz respeito à morfologia dos espermatozóides, verificou-se um aumento significativo da percentagem de anomalias múltiplas 5 dias após o início da exposição ao cromato de potássio e uma diminuição da percentagem de espermatozóides com morfologia normal após 35 dias. As alterações na morfologia espermática de roedores foram já anteriormente relacionadas com a exposição ao crómio (Li et al, 2001; Acharya et al, 2004; 2006).

Em ambos os períodos foram encontradas alterações na motilidade, tendo sido o período dos 5 dias o mais afectado, com uma diminuição da percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva em ambas as concentrações de crómio e, simultaneamente, um aumento da percentagem de espermatozóides imóveis. Verificou-se também uma forte correlação negativa entre a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e a dose de crómio administrada ( $r=-0,999$ ;  $p=0,03$ ), o que significa que a redução da motilidade dos espermatozóides é dependente da dose de crómio. Uma redução da motilidade devido à exposição ao cromato foi previamente detectada em ratos expostos a cromato de sódio (Ernst e Bonde, 1992) e em ratos (Murthy et al, 1991), coelhos (Yousef et al, 2006) e macacos Bonnet (Subramanian et al, 2006) expostos a dicromato de potássio.

Apesar da motilidade dos espermatozóides ter sido significativamente afectada pelo cromato de potássio 5 dias após o início da exposição, outros parâmetros como a viabilidade celular, ou a função mitocondrial não foram significativamente afectados ( $p>0,05$ ). Porém, foi detectada uma tendência para uma diminuição da função mitocondrial com o aumento da dose de crómio ( $r=-0,999$ ;  $p=0,0255$ ).

No segundo período de sacrifício (35 dias), ocorreu um aumento da percentagem de espermatozóides imóveis nos ratinhos administrados com 10 mg  $K_2CrO_4/kg$  pc. Tal como referido para o período dos 5 dias, este efeito não foi acompanhado por alterações significativas na sua função

mitocondrial ou viabilidade, apesar de haver uma tendência para uma descida em ambos os parâmetros. A função mitocondrial apresentou uma correlação negativa com a dose de crómio ( $r=0,997$ ;  $p=0,05$ ) e uma correlação positiva com a viabilidade dos espermatozóides ( $r=0,997$ ;  $p=0,049$ ). Estes dois parâmetros correlacionam-se ainda positivamente com o total de espermatozóides móveis progressivos e não progressivos ( $r=1$ ;  $p=0,0191$  para a viabilidade e  $r=0,999$ ;  $p=0,0314$  para a função mitocondrial). Tal como descrito na secção 4.3, as espécies reactivas de oxigénio geradas durante o processo de redução do Cr(VI) (Shi et al, 1999) ao induzirem danos oxidativos nos lípidos podem afectar indirectamente a motilidade dos espermatozóides.

Em relação à integridade do acrossoma, observou-se uma diminuição da percentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro 35 dias após o início da exposição, nos ratinhos administrados com 10 mg  $K_2CrO_4$ , indicando que ocorreu uma reacção acrossómica prematura. Este efeito foi também descrito para ratinhos expostos a  $[CrV-BT]^{2-}$  (Pereira et al, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que no processo de redução intracelular do crómio(VI) ocorre fragmentação do DNA (Tsapakos et al, 1983; Stearns et al, 1995). Assim, no presente trabalho pretendia-se avaliar se a administração do cromato de potássio  $[Cr(VI)]$  iria induzir fragmentação do DNA nos espermatozóides de ratinho. Os espermatozóides de ratinhos expostos a cromato de potássio apresentaram níveis de fragmentação do DNA, detectado pelo ensaio de TUNEL, superiores do que os respectivos controlo, tendo sido este efeito mais evidente após 35 dias. Contudo, nenhum destes parâmetros atingiu o nível de significância estatística ( $p>0,05$ ). No entanto, neste período os níveis de fragmentação de DNA correlacionaram-se fortemente com a dose de crómio administrada ( $r=1,0$ ;  $p=0,0106$ ). A percentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA correlacionou-se também positivamente com a percentagem de células com anomalias múltiplas ( $r=0,998$ ;  $p=0,0351$ ). No período dos 5 dias obteve-se uma correlação negativa entre a percentagem de células positivas para

TUNEL e a percentagem de células com morfologia normal ( $r=-1,0$ ;  $p=0,00527$ ).

Na diferenciação normal dos espermatozóides, a cromatina organiza-se de modo a tornar o DNA resistente à desnaturação. Anomalias na estrutura da cromatina fazem com que o DNA seja susceptível à desnaturação ácida. Tal como demonstrado no ensaio TUNEL, a exposição a cromato de potássio não originou alterações na estrutura da cromatina avaliadas pelo SCSA. Ao 5º dia após o início da exposição, observou-se uma correlação negativa entre a percentagem de HDS e a percentagem de espermatozóides progressivos ( $r=-1,0$ ;  $p=0,0183$ ). Esta associação entre a motilidade e a população HDS foi já descrita anteriormente (Giwerzman et al, 2003). A fracção HDS corresponde aos espermatozóides cujo núcleo não apresenta condensação completa, permitindo assim uma maior acessibilidade da laranja de acridina. A estabilização da estrutura da cromatina ocorre devido à oxidação dos grupos tiol dos resíduos livres de cisteína, originando assim uma estrutura mais rígida. Este processo ocorre no epidídimo, local onde os espermatozóides adquirem a mobilidade.

Nestes estudos concluiu-se que o cromato de potássio, nas doses de 5 e 10 mg/kg pc, originou um aumento da acumulação de crómio no testículo dos ratinhos. A exposição a este composto induziu uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos, não se tendo observado outras alterações histológicas quer no testículo, quer no epidídimo. A análise das subpopulações testiculares por citometria de fluxo não mostrou alterações significativas, corroborando assim os resultados histológicos. Por outro lado, a exposição ao cromato de potássio nas doses testadas alterou alguns parâmetros funcionais dos espermatozóides, nomeadamente a sua morfologia, integridade do acrossoma e motilidade. Relativamente aos parâmetros genotóxicos, não se observaram alterações na integridade do DNA ou na estrutura da cromatina nos espermatozóides dos ratinhos expostos 5 e 10 mg de cromato de potássio/kg pc.

## **5. CONCLUSÕES**

## 5.1 Conclusões gerais

No presente trabalho foram desenvolvidas novas ferramentas com objectivo de contribuir para uma melhor compreensão da toxicidade testicular.

- Foi apresentado o Snakes, um novo programa informático que permite, de um modo rigoroso, efectuar medições do diâmetro dos tubos seminíferos. Este programa foi posteriormente utilizado para fazer a avaliação do efeito do cloreto de chumbo, do cloreto de cádmio e do cromato de potássio nos tubos seminíferos de ratinhos.
- Foi optimizado um protocolo que permite, com elevado rigor, avaliar o conteúdo em DNA em amostras de testículo de ratinhos por citometria de fluxo, com recurso a material fixado. Das condições testadas, a fixação em formol tamponado e inclusão em parafina permitiu a melhor preservação do DNA. Esta técnica apresenta a grande vantagem de permitir, assim, o estudo das subpopulações de células do testículo, a partir de amostras preservadas durante longos períodos, e permite ainda executar várias réplicas, aumentando assim a fiabilidade dos estudos.
- O estudo quantitativo das populações de células do testículo, a partir de amostras incluídas em parafina deve ser considerado como uma abordagem útil no rastreio de toxicologia testicular, bem como um importante complemento da histopatologia.

Relativamente aos ensaios de toxicidade, o presente trabalho permitiu concluir que:

- O cloreto de chumbo aumentou significativamente a percentagem de células em fase S no testículo, o que pode indiciar alguma actividade mitogénica deste composto. Este composto induziu

uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos, contudo não se observaram outras alterações histológicas no testículo, ou no epidídimo.

- Demonstrou-se ainda o efeito do cloreto de chumbo em alguns parâmetros dos espermatozóides tais como a motilidade, morfologia e integridade do acrossoma. Contudo, não foram observados efeitos genotóxicos, apesar de se terem detectado algumas correlações entre os parâmetros fisiológicos/genotóxicos.
- A exposição a cloreto de cádmio induziu lesões severas e irreversíveis no testículo, que após 35 dias reverteram em necrose testicular. A análise das percentagens das células testiculares por citometria de fluxo, permitiu quantificar as alterações induzidas pelo cloreto de cádmio nas populações de celulares. A dose de cloreto de cádmio mais baixa testada e que não induziu alterações na histologia, induziu IMS no testículo após 35 dias.
- Devido às lesões necróticas induzidas pelo cloreto de cádmio nos testículos, a densidade espermática foi severamente diminuída após 35 dias. A exposição ao cloreto de cádmio afectou ainda a morfologia, a motilidade e induziu uma reacção acrossómica prematura nos espermatozóides.
- Este trabalho mostrou ainda os efeitos genotóxicos do cloreto de cádmio nos espermatozóides, com a indução de fragmentação de DNA, 35 dias após a exposição a este metal.
- A exposição ao cromato de potássio induziu uma redução do diâmetro dos tubos seminíferos. Não foram detectadas outras alterações histológicas significativas no testículo ou epidídimo. A análise das percentagens das células testiculares por citometria de fluxo permitiu corroborar estes resultados.
- O cromato de potássio induziu alterações na morfologia dos espermatozóides e na integridade do acrossoma, sobretudo nos animais



sacrificados após 35 dias. Verificou-se ainda uma redução da motilidade dos espermatozóides. No entanto, outros parâmetros como a densidade, a viabilidade e a função mitocondrial não foram afectados.

- O cromato de potássio não induziu fragmentação do DNA nos espermatozóides, apesar de se terem detectado algumas correlações entre estes parâmetros e os parâmetros fisiológicos.
- A motilidade dos espermatozóides mostrou ser um parâmetro bastante sensível à toxicidade de metais, concretamente do cloreto de chumbo, do cloreto de cádmio e do cromato de potássio. No entanto, outros parâmetros como a viabilidade e a função mitocondrial não foram afectados da mesma forma, o que indica que de um modo geral, estes metais afectam a motilidade dos espermatozóides por mecanismos diferentes dos que controlam a função mitocondrial e a viabilidade.
- Os resultados do presente trabalho sugerem ainda que o acrossoma seja um dos principais alvos da toxicidade do chumbo, do cádmio e do crómio nos espermatozóides, cuja reacção acrossómica prematura pode reduzir a capacidade do espermatozóide de penetrar a zona pelúcida e, consequentemente, de fertilizar o oócito.

## 5.2 Perspectivas futuras

Apesar das conclusões obtidas, estão em aberto algumas questões a aprofundar no futuro, nomeadamente:

- Estudar os mecanismos inerentes à reacção acrossómica prematura induzida por estes metais;
- Compreender a ausência de correlação entre alguns parâmetros que se esperaria serem correlacionáveis como a motilidade vs vitalidade vs função mitocondrial;
- Transpor estas metodologias para a avaliação da infertilidade masculina no homem e estabelecer protocolos/estratégias especialmente elaborados no âmbito da saúde ocupacional.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Acharya S, Acharya UR. *In vivo* lipid peroxidation responses of tissues in lead-treated Swiss mice. *Ind Health* 1997;35:542-544.
- Acharya UR, Acharya S, Mishra M. Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice. *Ind Health* 2003; 41:291-294.
- Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol* 2008; 25:84-88.
- Acharya UR, Mishra M, Tripathy RR, Mishra I. Testicular dysfunction and antioxidative defense system of Swiss mice after chronic acid exposure. *Reprod Toxicol* 2006; 22:87-91.
- Acharya UR, Rathmore RM, Mishra M. Role of Vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environ Toxicol. Pharmacol* 2003;13:9-14.
- Adhikari N, Sinha N, Narayan R, Saxena DK. Lead-induced cell death in testes of young rats. *J Appl Toxicol* 2001; 21:275-277.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 59: 2-11.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for lead. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 1999a.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for cadmium. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 1999b.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for chromium. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2000.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41:183-197.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the cell. In: Germ cells and fertilization. New York: Garland Science Taylor & Francis Group; 2002. Vol 4.
- Alexander BH, Checkoway H, van Netten C, Muller CH, Ewers TG, Kaufman JD, Mueller BA, Vaughan TL, Faustman EM. Semen quality of men employed at a lead smelter. *Occup Environ Med* 1996;53:411-416.
- Aoki A, Hoffer AP. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol Reprod* 1978;18:579-591.
- Aoyagi T, Ishikawa H, Miyaji K, Hayakawa K, Hata M. Cadmium-induced testicular damage in a rat model of subchronic intoxication. *Reprod Med Biol* 2002;1:59-63.

- Apostoli P, Kiss P, Porru S, Bonde JP, Vanhoorne M. Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. ASCLEPIOS Study Group Occup. Environ Med 1998;55:364-374.
- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radic Biol Med 1999;26:869-880.
- Aruldas MM, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, Akbarsha MA. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). Hum Reprod 2005;20:2801-2813.
- Au DWT, Reunov AA, Wu RSS. Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. Environ Pollut 2001;111: 11-20.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. Reproduction 2005; 29:505-514.
- Basaran N, Undeger U. Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers. Am J Ind Med 2000; 38:349-354.
- Batra N, Nehru B, Bansal MP. Influence of lead and zinc on rat male reproduction at 'biochemical and histopathological levels'. J Appl Toxicol 2001; 21: 507-512.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation J Androl 2000;21:895-902.
- Belagyi J, Pas M, Raspor P, Pesti M, Pali T. Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1999; 1421:175-182.
- Bell CE, Baldwin LA, Kostecki PT, Calabrese EJ. Comparative responses of rainbow trout and rat to the liver mitogen lead. Ecotoxicol Environ Saf 1993;26: 280-284.
- Bench G, Corzett MH, Martinelli R, Balhorn R. Cadmium concentrations in the testes, sperm, and spermatids of mice subjected to long-term cadmium chloride exposure. Cytometry 1999; 35:30-36.
- Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. Fertil Steril 1997;67:336-347.

Benoff S, Hurley IR, Millan C, Napolitano B, Centola GM. Seminal lead concentrations negatively affect outcomes of artificial insemination. *Fertil Steril* 2003; 80:517–525.

Bhasin S, de Kretser DM, Baker HW. Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1525-1529.

Blake CA, Boockfor FR, Nair-Menon JU, Millette CF, Raychoudhury SS, McCoy GL. Effects of 4-*tert*-octylphenol given in drinking water for 4 months on the male reproductive system of Fischer 344 rats. *Reprod Toxicol* 2004; 18:43-51.

Blanco A, Moyano R, Vivo J, Flores-Acuña R, Molina A, Blanco C, Agüera E, Monterde JG. Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007; 23:96–101.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257.

Bonde JP, Apostoli P. Any need to revisit the male reproductive toxicity of lead? *Occup Environ Med* 2005;62:2-3.

Bonde JP, Ernst E. Sex hormones and semen quality in welders exposed to hexavalent chromium. *Hum Exp Toxicol* 1992;11: 259-263.

Bonde JP, Joffe M, Apostoli P, Dale A, Kiss P, Spano M, Caruso F, Giwercman A, Bisanti L, Porru S, Vanhoorne M, Comhaire F, Zschiesche W. Sperm count and chromatin structure in men exposed to inorganic lead: lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med* 2002; 59:234-242.

Brunner M, Albertini S, Würigler FE,. Effects of 10 known or suspected spindle poisons in the in vitro porcine brain tubulin assembly assay. *Mutagenesis* 1991; 6: 65-70.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spanò M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007; 22:174-179.

Bustos-Obregón E, González-Hormazabal P. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J Androl* 2003;5:105-107.

Cao W, Gerton GL, Moss SB. Proteomic profiling of accessory structures from the mouse sperm flagellum. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:801-810.

Cardone A, Comitato R, Angelini F. Spermatogenesis, epididymis morphology and plasma sex steroid secretion in the male lizard *Podarcis sicula* exposed to diuron. *Environ Res* 2008;108:214-223.

Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M, Chaube SK. Chromium induced testicular impairment in relation to adrenocortical activities in adult albino rats. *Reprod Toxicol* 2007;24:388-396.

Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002;82:825-874.

Chiu A, Katz AJ, Beaubier J, Chiu N, Shi X. Genetic and cellular mechanisms in chromium and nickel carcinogenesis considering epidemiologic findings. *Mol Cell Biochem* 2004; 255:181-194.

Cho HW, Nie R, Carnes K, Zhou Q, Sharief NA, Hess RA. The antiestrogen ICI 182,780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:57.

Chung NP, Cheng CY. Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology* 2001;142:1878-1888.

Cooke HJ, Saunders PT. Mouse models of male infertility. *Nat Rev Genet* 2002; 3:790-801.

Costa M, Klein CB. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Crit Rev Toxicol.* 2006 ;36:155-63.

Creasy DM, Foster PMD. Male reproductive system. In: Haschek WM, Rousseaux CG, editors. *Handbook of toxicologic pathology*. San Diego: Academic Press; 2002. p. 829-889.

Dalton TP, He L, Wang B, Miller ML, Jin L, Stringer KF, Chang X, Baxter CS, Nebert DW. Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3401-3406.

Dalton TP, Miller ML, Wu X, Menon A, Cianciolo E, McKinnon RA, Smith PW, Robinson LJ, Nebert DW. Refining the mouse chromosomal location of Cdm, the major gene associated with susceptibility to cadmium-induced testicular necrosis. *Pharmacogenetics* 2000;10:141-151.

das Neves RP, Santos TM, de Pereira ML, de Jesus JP. Chromium(VI) induced alterations in mouse spleen cells: a short-term assay. *Cytobios.* 2001;106 Suppl 1:27-34.

das Neves RP, Santos TM, Pereira M de L, de Jesus JP. Comparative histological studies on liver of mice exposed to Cr(VI) and Cr(V) compounds. *Hum Exp Toxicol.* 2002;21:365-9

Dayan AD, Paine AJ. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:439-451.

de Kretser DM, Baker HW. Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3443-3450.

de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368-378.

de Melo-Martin I. On cloning human beings. *Bioethics* 2002;16:246-265.

Diemer T, Desjardins C. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999;5:120-140.

Ding M, Shi X. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2002; 234: -235: 293-300.

Dohle GR. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia*. 2003;35:321-324

Ekong EB, Jaar BG, Weaver VM. Lead-related nephrotoxicity: A review of the epidemiologic evidence. *Kidney Int* 2006;70:2074-2084.

El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol* 2004;42:1563-1571.

Ernst E, Bonde JP. Sex hormones and epididymal sperm parameters in rats following sub-chronic treatment with hexavalent chromium. *Hum Exp Toxicol*. 1992;11:255-258.

Ernst E. Testicular toxicity following short-term exposure to tri- and hexavalent chromium: an experimental study in the rat. *Toxicol Lett* 1990; 51:269-275.

ESHRE Monographs: Manual on Basic semen Analysis. Sperm Morphology pp:13-17, 2002.

Evenson D, Darzynkiewicz Z, Jost L, Janca F, Ballanchey B. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry*. 1986;7:45-53.

Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Sci* 2000; 22:169-189.

Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 2006; 22:133-41.



- Figà-Talamanca I, Petrelli G, Tropeano R, Papa G, Boccia G. Fertility of male workers of the Italian mint. *Reprod Toxicol* 2000; 14:325-330.
- Figà-Talamanca I, Traina ME, Urbani E. Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med* 2001; 51: 174-188.
- Foot RH. Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reprod Toxicol* 1999;13: 269-277.
- Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci* 2007;12: 2890-911.
- Fraser LR: Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *J Reprod Fert* 1984; 72: 373-384.
- Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm Chromatin. *Arch Androl* 2000; 45:215-225.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 57: 1401-1406.
- Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213:282-90
- Giwerzman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, Spano M. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003; 80: 1404-1412.
- Golan R, Vigodner M, Oschry Y, Schocat L, Lewin LM. Chromatin condensation during spermiogenesis in the golden hamster (*Mesocricetus aureus*): a flow cytometric study. *Mol. Reprod Develop* 2000; 56:105-112.
- Gordenin DA. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 2003;34:326-329.
- Gouveia MA. The testes in cadmium intoxication: morphological and vascular aspects. *Andrologia* 1988; 20:225-231.
- Graça A, Ramalho-Santos J, Pereira ML. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. *Asian J Androl* 2004;6: 237-241.
- Guevara MA, Silva A, Oliveira H, Pereira ML, Morgado F. Segmentation and Morphometry of Histological Sections using Deformable Models: A new tool for evaluating testicular histopathology. In: Sanfeliu A, Shulcoper J R, editors. *Progress in Pattern Recognition, Speech and Image Analysis: Ciarp 2003. Lect Notes Comput Sci* 2003; 2905: 282-290.

Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008;40:354-360.

Gunn SA, Gould TC, Anderson WA Strain differences in susceptibility of mice and rats to cadmium-induced testicular damage *J Reprod Fertil* 1965;10:273-275.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482-488.

Gurer-Orhan H, Sabir HU, Ozgunes H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology* 2004; 195:147-154.

Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem.* 1983; 31: 1333-1335.

Hedley DW. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry.* 1989;10:229-241.

Hernandez-Ochoa I, Garcia-Vargas G, Lopez-Carrillo L, Rubio-Andrade M, Moran-Martinez J, Cebrian ME, Quintanilla-Vega B. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol* 2005; 20:221-228.

Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. *Reprod Toxicol* 2006; 21:171-178.

Hew KW, Ericson WA, Welsh MJ. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;121:15-21.

Hew KW, Heath GL, Jiwa AH, Welsh MJ. Cadmium *in vivo* causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 1993; 49:840-849.

Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Ernst E, Henriksen TB, Kolstad HA, *et al.* Semen quality and sex hormones with reference to metal welding. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 91-95.

Hsu PC, Hsu CC, Liu MY, Chen LY, Guo YL. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 55:45-64.

Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Lead exposure causes generation of reactive oxygen species and functional impairment in rat sperm. *Toxicology* 1997;122:133-143.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 1993;58:119–146.

Jagetia GC, Jyothi P, Krishnamurthy H. Flow cytometric evaluation of the effect of various doses of vindesine sulphate on mouse spermatogenesis. *Reprod Toxicol* 1997;11:867-874.

Jagetia GC, Krishnamurthy H, Jyothy P. Evaluation of cytotoxic effects of different doses of vinblastine on mouse spermatogenesis by flow cytometry. *Toxicology* 1996;112: 227-236.

Järup L. Cadmium overload and toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 2:35-39.

Jensen TK, Bonde JP, Joffe M. The influence of occupational exposure on male reproductive function. *Occup Med (Lond)* 2006;56:544-553.

Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nat Genet* 2003;34:326-9.

Johansson L, Pellicciari CE. Lead-induced changes in the stabilization of mouse sperm chromatin. *Toxicology* 1988;51:11-24.

Johansson L. Premature acrosome reaction in spermatozoa from lead-exposed mice *Toxicology* 1989;54:151-162.

Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS, et al. The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 2005;73:404-13

Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology: text and atlas. 11th ed. New york: McGraw-Hill; 2005

Kabbarah O, Mallon M, Pfeifer J, Edelmann W, Kucherlapati R, Goodfellow P. A panel of repeat markers for detection of microsatellite instability in murine tumors. *Mol Carcinog* 2003; 38:155-159.

Kanous KS, Casey C, Lindemann CB. Inhibition of microtubule sliding by Ni<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>: evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axoneme. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993;26:66-76.

Kawahara A, Yoshizuka M, Hirano T, Ohsato K, Fujimoto S. Cadmium toxicity in perinatal rat hepatocytes: electron microscopy, X-ray microanalysis, and morphometric analysis. *Exp Mol Pathol* 1990;53:180-190.

Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:267-94.

- Kumar S, Sathwara NG, Gautam AK, Agarwal K, Shah B, Kulkarni PK, et al. Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium. *J Occup Health* 2005;47:424-430.
- Kvist U, Björndahl L, editors. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs 2. Oxford: Oxford University Press; 2002
- Lakoski KA, Carron CP, Cabot CL, Saling PM. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen. *Biol Reprod* 1988; 38:221-233.
- Lanning LL, Creasy DM, Chapin RE, Mann PC, Barlow NJ, Reagan KS, et al. Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol Pathol* 2002;30:507-20.
- Larson JL, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev* 1999;52: 45-459.
- Leoni G, Bogliolo L, Deiana G, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, Ledda S, Naitana S. Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol* 2002;16:371-77.
- Li H, Chen Q, Li S, Yao W, Li L, Shi X, et al. Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Ann Occup Hyg* 2001;45:505-511.
- Lindemann C, Gardner TK, Westbrook E, Kanous KS. The calcium-induced curvature reversal of rat sperm is potentiated by camp and inhibited by anti-calmodulin. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991;20:316-324.
- Liu J, Corton C, Dix DJ, Liu Y, Waalkes MP, Klaassen CD. Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;176:1-9.
- Lu Q, Shur BD. Sperm from  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* 1997; 124: 4121-4131.
- Lugon-Moulin N, Martin F, Krauss MR, Ramey PB, Rossi L. Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* 2006;63:1074-1086.
- Lui WY, Lee WM. Mechanisms of reorganization of cell-cell junctions in the testis. *Front Biosci* 2008;13:6775-86.
- Marchlewicz M, Protasowicki M, Rozewicka L, Piasecka M, Laszczynska M. Effect of long-term exposure to lead on testis and epididymis in rats. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 1993;31:55-62.
- McMurray CT, Tainer JA. Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat Genet* 2003;34:239-241.

- Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *J Trace Elem Med Biol* 2004; 18:173-178.
- Misra RR, Crance KA, Bare RM, Waalkes MP. Lack of correlation between the inducibility of metallothionein mRNA and metallothionein protein in cadmium-exposed rodents. *Toxicology* 1997;117:99-109.
- Moorman WJ, Skaggs SR, Clark JC, Turner TW, Sharpnack DD, Murrell JA, Simon SD, Chapin RE, Schrader SM. Male reproductive effects of lead, including species extrapolation for the rabbit model. *Reprod Toxicol* 1998;12:333-346.
- Mora LB, Moscinski LC, Diaz JI, Blair P, Cantor AB, Pow-Sang JM. Stage B Prostate Cancer: Correlation of DNA Ploidy analysis with histological and clinical parameters. *Cancer Control* 1999;6:587-591.
- Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, Gambera L, Baccetti B, Biagiotti R, Forti G, Maggi M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;21:903-912.
- Murthy RC, Gupta SK, Saxena DK. Nuclear alterations during acrosomal cap formation in spermatids of lead-treated rats. *Reprod Toxicol* 1995;9:483-489.
- Murthy RC, Saxena DK, Gupta SK, Chandra SV. Ultrastructural observations in testicular tissue of chromium-treated rats. *Reprod Toxicol* 1991;5:443-447.
- National Toxicology Program. 11th Report on Carcinogens. Research Triangle Park, NC:National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences; 2005.
- Nolan CV, Shaikh ZA. An evaluation of tissue metallothionein and genetic resistance to cadmium toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;85:135-44.
- Nordberg GF. Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice. *Env Physiol* 1971; 1:171-187.
- Oakberg EF Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium *Am J Anat* 1956; 99:507-16.
- O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 2003; 533: 3-36.
- Oliveira H, Santos TM, Ramalho-Santos J, Pereira M L. Histopathological effects of hexavalent chromium in mice kidney. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006; 676: 977-983.
- Oskam I C, Ropstad E, Smith AJ, Skaare J U, Tverdal A, Berg KA, et al. Effects of PCB99 and PCB153 exposure on spermatogenesis in young adult C57BL6 mice. *Reprod Toxicol* 2004;19:169-180.

- Otto FJ. Preparation of cells for light-resolution DNA analysis. In: Radbuch A, editor. Flow cytometry and cell sorting. Berlin: Springer-Verlag; 1992
- Papaioannou KZ, Murphy RP, Monks RS, Hynes N, Ryan MP, Boland MP, et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. *Theriogenology* 1997;48:299-312.
- Parizek J, Zahor Z. Effect of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 1956;177:1036.
- Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-740.
- Pereira ML, das Neves RP, Oliveira H, Santos TM, de Jesus JP. Effect of Cr(V) on reproductive organ morphology and sperm parameters: an experimental study in mice. *Environ Health* 2005; 27: 4-9.
- Pereira ML, Santos TM, das Neves RP, Costa FG, de Jesus JP. Cr(V) involvement in the toxicity pathway of testicular damage. *Asian J Androl* 2002; 4: 153-155.
- Pereira ML, Santos TM, Garcia e Costa F, de Jesus JP. Functional changes of mice Sertoli cells induced by Cr(V). *Cell Biol Toxicol* 2004 20:285-291.
- Perreault SD, Aitken RJ, Baker HW, Evenson DP, Huszar G, Irvine DS, et al. Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *Adv Exp Med Biol* 2003; 518:253-268.
- Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202:189-198.
- Pinon-Lataillade G, Thoreux-Manlay A, Coffigny H, Masse R, Soufir JC. Reproductive toxicity of chronic lead exposure in male and female mice. *Hum Exp Toxicol* 1995; 14:872-878.
- Pinon-Lataillade G, Thoreux-Manlay A, Coffigny H, Monchaux G, Masse R, Soufir JC. Effect of ingestion and inhalation of lead on the reproductive system and fertility of adult male rats and their progeny. *Hum Exp Toxicol* 1993; 12: 165-172.
- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999;423:103-11.
- Prozialeck WC. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;164:231-249.
- Quintanilla-Vega B, Hoover DJ, Bal W, Silbergeld EK, Waalkes MP, Anderson LD. Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chem Res Toxicol* 2000; 13:594-600.

- Ragan HA, Mast TJ. Cadmium inhalation and male reproductive toxicity. *Rev Environ Contam Toxicol* 1990;114:1-22.
- Razani-Boroujerdi S, Edwards B, Sopori ML. Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell-B cell interaction. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288:714-719.
- Ren XY, Zhou Y, Zhang JP, Feng WH, Jiao BH. Metallothionein gene expression under different time in testicular Sertoli and spermatogenic cells of rats treated with cadmium. *Reprod Toxicol* 2003; 17: 219-227.
- Rikans LE, Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 110-117.
- Robaire B, Viger RS. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995;52:226-236.
- Robards K, Worsfold P. Cadmium: toxicology and analysis. A review. *Analyst* 1991;116: 549-568.
- Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press; 1990.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995;16:80-87.
- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23:737-52.
- Sallmén M. Exposure to lead and male fertility. *Int J Occup Med Environ Health* 2001;14:219-222.
- Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:12.
- Saradha B, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21:34-41.
- Schlaepfer WW. Sequential study of endothelial changes in acute cadmium intoxication. *Lab Invest* 1971;25:556-564.
- Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *J Androl* 2007; 28:706-716.
- Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod* 2000;15:1314-1321.

Shen Y, Sangiah S. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice. *Arch Environ Contam Toxicol* 1995; 29:174-179.

Shi X, Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V. Reduction of chromium(VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B* 1999; 2: 87-104.

Shiau CY, Wang JD, Chen PC. Decreased fecundity among male lead workers. *Occup Environ Med* 2004;61:915-923.

Silbergeld EK. Toward the twenty-first century: lessons from lead and lessons yet to learn. *Environ Health Perspect* 1990; 86: 191-196.

Sokol RZ, Berman N. The effect of age exposure on lead induced testicular toxicity. *Toxicology* 1991;69:269-278.

Sokol RZ, Wang S, Wan YJ, Stanczyk FZ, Gentzsch E, Chapin RE. Long-term, low-dose lead exposure alters the gonadotropin-releasing hormone system in the male rat. *Environ Health Perspect* 2002; 110:871-874.

Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:395-406.

Spanò M, Bartoleschi C, Cordelli E, Leter G, Segre L. Flow cytometric and histological assessment of 1,2:3,4-diepoxybutane toxicity on mouse spermatogenesis. *J Toxicol Env Health* 1996; 47: 423-441.

Spanò M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73: 43-50.

Spanò M, Evenson DP. Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biol Cell* 1993; 78:53-62.

Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman A. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006; 21:3199-3205.

Stearns DM, Kennedy LJ, Courtney KD, Giangrande PH, Phieffer LS, Wetterhahn KE. Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks *in vitro*. *Biochemistry* 1995;34:910-9

Subramanian S, Rajendiran G, Sekhar P, Gowri C, Govindarajulu P, Aruldas MM. Reproductive toxicity of chromium in adult bonnet monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible oxidative stress in the semen. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;215:237-249.

Sudwan P, Saenphet K, Aritajat S, Sitasuwan N. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behaviour of male rats. *Asian J Androl* 2007;9:849-855.



- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1997;56:602-607.
- Suter L, Meier G, Bechter R, Bobadilla M. Flow cytometry as a sensitive tool to access testicular damage in rat. *Arch Toxicol* 1998;72:791-797.
- Sutter L, Koch E, Bechter R, Bobadilla M. Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry* 1997; 27:161-168.
- Swiergosz-Kowalewska R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc Res Tech* 2001;55:208-22.
- Szczech GM, Russel LD. Commentary on the application of refined morphologic evaluation of the testis to the practice of toxicologic pathology. *Toxicol Pathol* 1997;25:230-237.
- Tayama K, Fujita H, Takahashi H, Nagasawa A, Yano N, Yuzawa K, Ogata A. Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: a simple and inexpensive method. *Reprod Toxicol* 2006; 22:92-101.
- Telisman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Rocić B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000;108:45-53.
- Thoreux-Manlay A, Velez de la Calle JF, Olivier MF, Soufir JC, Masse R, Pinon-Lataillade G. Impairment of testicular endocrine function after lead intoxication in the adult rat. *Toxicology* 1995;100:101-109.
- Traina ME, Guarino M, Urbani E, Saso L, Eleuteri P, Cordelli E, et al. Lonidamine transiently affects spermatogenesis in pubertal CD1 mice. *Contraception* 2005; 72:262- 267.
- Tsapakos MJ, Hampton TH, Wetterhahn KE. Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver, and lung. *Cancer Res* 1983;43:5662-667.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR, Pereira BM. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 1998; 240:151-164.
- Turner TT. De Graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 2008;29:237-250.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96: 261-268.

- Viskum S, Rabjerg L, Jorgensen PJ, Grandjean P. Improvement in semen quality associated with decreasing occupational lead exposure. *Am J Ind Med* 1999; 35: 257-263.
- Wadi SA, Ahmad G. Effects of lead on the male reproductive system in mice. *J Toxicol Environ Health A* 1999;56:513-521.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003;192:95-117.
- Wallin M, Hartley-Asp B. Effects of potential aneuploidy inducing agents on microtubule assembly *in vitro*. *Mutat Res* 1993;287:17-22.
- Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007;77:190-201.
- WHO. Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva: World Health Organization; 1991.
- Wong CH, Mruk DD, Lui WY, Cheng CY. Regulation of blood-testis barrier dynamics: an *in vivo* study. *J Cell Sci* 2004;117:783-798.
- Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:4425-4429.
- Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE, Ong CN. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutat Res* 2003;534:155-163.
- Xu LC, Wang SY, Yang XF, Wang XR. Effects of cadmium on rat sperm motility evaluated with computer assisted sperm analysis. *Biomed Environ Sci* 2001;14:312-317.
- Yang HS, Han DK, Kim JR, Sim JC. Effects of alpha-tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J Korean Med Sci* 2006;21:445-451.
- Yoshinaga K, Toshimori K. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech* 2003;61:39-45.
- Yoshizuka M, Mori N, Hamasaki K, Tanaka I, Yokoyama M, Hara K, Doi Y, Umezu Y, Araki H, Sakamoto Y, Miyazaki M, Fujimoto S. Cadmium toxicity in the thyroid gland of pregnant rats. *Exp Mol Pathol* 1991;55:97-104.
- Yousef MI, El-Demerdash FM, Kamil KI, Elaswad FA. Ameliorating effect of folic acid on chromium(VI)-induced changes in reproductive performance and seminal plasma biochemistry in male rabbits. *Reprod Toxicol* 2006 21:322-328.

Zar JH. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall International Inc; 1996.

Zeng H, Tulsiani DRP. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci* 2003;116:1981-1989.

Zhitkovich A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol* 2005;18:3-11.

Zhou T, Jia X, Chapin RE, Maronpot RR, Harris MW, Liu J, et al. Cadmium at a non-toxic dose alters gene expression in mouse testes. *Toxicol Lett* 2004;154:191-200.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 Processamento histológico

Fase	Composto	Tempo
Fixação	Solução de Bouin	24 horas
	Etanol a 70°	24 horas
	Etanol a 90°	1 hora
Desidratação	Etanol a 100°	30 minutos
	Etanol a 100 °	1 hora
	Etanol a 100° + Benzol	30 minutos
	Benzol	1 hora e 30 minutos
Impregnação	Benzol + Parafina ponto fusão 42-44°C	30 minutos a temperatura ambiente + 1 hora a 40°C
	Parafina ponto fusão 42-44°C	1 hora a 60°C
	Parafina ponto fusão 52-58°C	30 minutos a 60°C
	Parafina ponto fusão 52-58°C	
Inclusão	Parafina ponto fusão 52-58°C	

## ANEXO 2 Procedimento de coloração

Fase	Composto	Tempo
<b>Desparafinação</b>	Xilol	10 minutos
<b>Re-hidratação</b>	Etanol a 100°	5 minutos
	Etanol a 95°	5 minutos
	Etanol a 75°	5 minutos
	Etanol a 50°	5 minutos
	Água corrente	15-30 minutos
<b>Coloração</b>	Hematoxilina	15 minutos
	Água corrente	15 minutos
	Eosina	2 minutos
<b>Desidratação</b>	Etanol a 95°	Passagem
	Etanol a 100°	Passagem
<b>Clareamento</b>	Xilol	Passagem

## ANEXO 3 Soluções

- **Solução de PBS 1 L (1X)**

7,6 g NaCl

1,24 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,414 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- **Paraformaldeído a 1%**

2,5 mL solução stock de paraformaldeído

7,5 mL de PBS 1x

- **Solução stock de paraformaldeído**

4 g paraformaldeído

40 mL  $\text{H}_2\text{O}$  a 65°C

10  $\mu\text{L}$  NaOH 10 N

10 mL PBS 10X

Prefazer até 100 mL com  $\text{H}_2\text{O}$

Guardar no máximo até 1 mês

- **Gel de agarose a 1%**

25 mL de tampão TBE 1x

0,25 g de agarose

1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio

- **Tampão TBE 1L (5x)**

54 g Tris base

27,5 g ácido bórico

20 mL EDTA 0,5 M (pH 8,0)